



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CANDIDA NÃO ALBICANS COMO PATOGÉNICOS EMERGENTES

Trabalho submetido por
Francisca Moreira Raposo de Mello Vieira
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Novembro de 2016



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CANDIDA NÃO ALBICANS COMO PATOGÉNICOS EMERGENTES

Trabalho submetido por
Francisca Moreira Raposo de Mello Vieira
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Mestre Teresa Maria da Silva do Nascimento

Novembro de 2016

Agradecimentos

Com a realização desta tese de Mestrado aproxima-se o final de um longo caminho de muito trabalho, dedicação, aprendizagem e muitas alegrias.

Não podia deixar de agradecer a algumas pessoas que contribuíram para a minha formação.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Mestre Teresa Maria da Silva do Nascimento, por toda a orientação científica, por todos os conhecimentos transmitidos, disponibilidade, conselhos e sugestões.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Maria João e Jorge, e aos meus avós por todo o apoio prestado, confiança no meu trabalho e força transmitida, e um especial agradecimento ao meu irmão, Bernardo, por toda a amizade, motivação e partilha de conhecimentos.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos os meus amigos por toda a ajuda e amizade. Sem dúvida tornaram este caminho mais valioso.

A todos, o meu sincero obrigada.

Resumo

As espécies do género *Candida*, comensais no Homem, podem tornar-se patogénicas quando existe um desequilíbrio na resposta do sistema imunitário, desencadeando infecções superficiais ou sistémicas. Embora *Candida albicans* (*C. albicans*) seja considerada a espécie com maior patogenicidade, dados epidemiológicos apontam para a emergência das espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA), nomeadamente em ambiente hospitalar.

São diversos os factores responsáveis pelo incremento de infecções por CNA, relacionados com o agente patogénico, hospedeiro e fármaco. Merecem destaque a frágil imunidade do hospedeiro, nomeadamente os indivíduos VIH/SIDA, bem como a evolução dos procedimentos médicos e utilização de técnicas cirúrgicas invasivas. Os factores de virulência apresentados por estas espécies são também decisivos para expressão da sua patogenicidade e estabelecimento da infecção.

A emergência das espécies não-*albicans* deve-se igualmente aos mecanismos de resistência, intrínsecos ou adquiridos, aos antifúngicos convencionalmente utilizados e aos mecanismos de adaptação e sobrevivência na célula hospedeira, sendo fundamental a sua compreensão para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas eficazes.

O diagnóstico e terapêutica destas infecções constituem um verdadeiro desafio, devendo instituir-se tratamento o mais rapidamente possível. No entanto, se por um lado a utilização empírica de agentes antifúngicos se correlaciona com o incremento da resistência das espécies de CNA aos mesmos, os testes de susceptibilidade aos antifúngicos funcionam como auxiliares para uma terapêutica direccionada, estando-lhe inerente uma diminuição no desenvolvimento de espécies resistentes.

Palavras-chave: *Candida* não-*albicans*; resistência aos antifúngicos; candidose invasiva; factores de virulência.

Abstract

The species from the genus *Candida*, commensals in Humans, may become pathogenic when there is an imbalance in the immune system response, triggering superficial or systemic infections. Although *Candida albicans* (*C. albicans*) is identified as one of the most pathogenic species, epidemiological data points to the emergence of non-*albicans* *Candida* (NAC) species, especially in the hospital setting.

There are several factors responsible for the increase of NAC infections, which are related to the pathogen, host and drug. The frailty of the host deserves special attention, due to being associated with the increasing number of HIV/AIDS individuals, as well as the development of medical procedures and use of invasive surgical techniques. The virulence factors presented by these species also play an important role in the expression of pathogenicity and establishment of infection.

The emergence of non-*albicans* *Candida* species is not only associated with the mechanisms of resistance, intrinsic or acquired, to the conventionally antifungal agents used but also due to the mechanisms of adaptation and survival within the host cell. The understanding of the latter factors is fundamental for the development of effective therapeutic approaches.

The diagnosis and treatment of these infections poses to be a real challenge and treatment should be implemented as soon as possible. However, on one hand the empirical use of antifungal agents correlates with increased resistance of NAC species, on the other hand the antifungal susceptibility testing acts as an auxiliary for targeted therapy, and it is implicit a reduction in the development of resistant species.

Keywords: Non-*albicans* *Candida* species; antifungal resistance; invasive candidiasis; virulence factors.

Índice Geral

1. Introdução.....	13
2. <i>Candida</i> spp.....	17
2.1. Biologia e Taxonomia.....	17
2.2. Epidemiologia.....	19
2.2.1. Epidemiologia em Portugal	21
2.3. Factores de risco do hospedeiro	21
2.4. Factores de virulência	25
2.4.1. Adesão	26
2.4.2. Biofilme.....	27
2.4.3. Morfogénese	29
2.4.4. Enzimas	29
2.4.5. Potencial oxidativo	31
2.4.6. <i>Switch</i> fenotípico	32
2.5. Patogénese da infecção	32
2.6. Resposta do Hospedeiro.....	35
2.7. Interesse clínico	37
3. Identificação laboratorial.....	41
3.1. Métodos convencionais.....	41
3.2. Métodos serológicos e moleculares	44
4. Tratamento	47
4.1. Fármacos antifúngicos	47
4.1.1. Azóis.....	47
4.1.2. Polienos	48
4.1.3. Equinocandinas.....	49
4.2. Resistência aos AF	50

4.2.1. Mecanismos de resistência	52
4.2.2. Biofilmes	61
4.3. Terapêuticas	62
5. Conclusão	67
6. Referências bibliográficas	69

Índice de Figuras

Figura 1. Morfologias de <i>C. albicans</i>	18
Figura 2. Mecanismos de patogenicidade de <i>C. albicans</i>	25
Figura 3. Etapas no processo de formação de um biofilme.....	27
Figura 4. Mecanismos de patogénese da infecção por <i>Candida</i>	33
Figura 5. Patogénese da CI.	34
Figura 6. Principais PRR envolvidos no reconhecimento de <i>Candida</i>	36
Figura 7. Classes de AF e respectivos alvos celulares..	47
Figura 8. Estrutura química das moléculas de AmB (A), colesterol (B) e ergosterol (C).	48
Figura 9. Mecanismos de resistência aos azóis em <i>C. albicans</i>	53
Figura 10. Mecanismos de resistência às equinocandinas em <i>C. albicans</i>	56
Figura 11. Factores que contribuem para a resistência aos AF.	62
Figura 12. Tipos de tratamento para suspeita de candidose em doentes em estado crítico.	63

Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação taxonómica de <i>Candida</i> spp.	17
Tabela 2. Características morfológicas das espécies de <i>Candida</i>	19
Tabela 3. Factores de risco/predisponentes ao desenvolvimento de candidose cutânea/mucocutânea.....	22
Tabela 4. Factores de risco para o desenvolvimento de CI.	23
Tabela 5. Características e factores de risco/predisponentes responsáveis pela emergência das espécies de CNA.....	24
Tabela 6. Características dos biofilmes de <i>Candida</i> spp. e principais genes reguladores.	28
Tabela 7. Caracterização das candidoses cutâneas e mucocutâneas.....	38
Tabela 8. Caracterização das candidoses invasivas.....	39
Tabela 9. Manifestações clínicas relevantes associadas a espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i>	40
Tabela 10. Características do teste ideal para diagnóstico de CI.....	41
Tabela 11. Características fenotípicas do diagnóstico laboratorial de <i>Candida</i>	43
Tabela 12. Fármacos antifúngicos e respectivos mecanismos de acção.....	50
Tabela 13. Padrões de susceptibilidade das espécies de <i>Candida</i> aos fármacos AF.....	51
Tabela 14. Classificação dos tipos de resistência.	51
Tabela 15. Mecanismos de resistência das espécies de CNA aos AF.	60
Tabela 16. Tratamento das candidoses superficiais segundo as recomendações da IDSA.....	63
Tabela 17. Recomendações da IDSA para o tratamento de candidemia e candidose invasiva em adultos.	65

Lista de Abreviaturas

ABC –ATP-binding cassette

AF – Antifúngico(s)

ALS – Agglutinine-like sequence

AmB – Anfotericina B

ANID - Anidulafungina

BCR1 – *Biofilme and Cell wall Regulator 1*

CASP - Caspofungina

CDR – *Candida Drug Resistance*

CI – Candidose invasiva

CLRs – Lecitinas do tipo C

CMI – Concentração mínima inibitória

CNA – *Candida não-albicans*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EPA – Adesinas epiteliais

ESCMID - *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases*

FCZ – Fluconazol

ICZ – Itraconazol

IDSA – *Infectious Diseases Society of America*

IV - Intravenoso

MDR – *Multidrug resistance*

MFS – *Major Facilitators Superfamily*

MICA - Micafungina

PAMPS – Padrões moleculares associados ao agente patogénico

PCZ – Posaconazol

PRR – Receptores de reconhecimento padrão

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reactivas ao oxigénio

SIDA – Síndrome da imunodeficiência humana adquirida

Sap – Aspartil proteinases secretórias

TLRs – Receptores *Toll-like*

TSAF – Testes de susceptibilidade aos antifúngicos

UCI – Unidade de Cuidados Intensivos

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VCZ – Voriconazol

5-FC – 5-fluorocitosina

1. Introdução

O estudo dos fungos com capacidade para provocar doença engloba o ramo da Micologia Médica. Os anos 70 possibilitaram desenvolvimentos nesta área, nomeadamente nos campos laboratorial, taxonómico, epidemiológico e clínico, permitindo uma melhor detecção, identificação e tratamento das infecções fúngicas (Brandt & Lockhart, 2012; Párola, 2010). *C. albicans*, considerado o fungo com maior grau de patogenicidade do género, foi isolado pela primeira vez em 1839, pelo cientista Langenbeck. A partir do século XIX, Agostino Bassi, intitulado o pai da Micologia Médica, contribuiu através das suas pesquisas para um maior conhecimento sobre as doenças fúngicas (Giolo & Svidzinski, 2010; Spampinato & Leonardi, 2013).

As infecções fúngicas são muitas vezes desvalorizadas, apesar de algumas terem taxas de mortalidade semelhantes às da tuberculose ou malária (Brown, Denning, & Levitz, 2012). Segundo a *World Health Organization* (WHO, 2016), uma infecção emergente é definida como uma infecção que surge pela primeira vez em determinada população ou uma infecção que poderá ter existido e cuja incidência tem vindo a aumentar rapidamente.

Desde as últimas décadas que se assiste à emergência das infecções por *Candida*, sendo diversos os factores de risco que contribuem para tal, nomeadamente o avanço na área da medicina – quimioterapia, transplantação, hemodiálise, nutrição parentérica e utilização de cateter venoso central (CVC) – bem como o aumento dos casos de VIH/SIDA (Deorukhkar & Saini, 2015a; Mayer, Wilson, & Hube, 2013; Sanglard, 2016; Zarrin & Mahmoudabadi, 2009).

Candida spp., sendo um fungo oportunista, desencadeia diversas infecções, sendo mais prevalentes em hospedeiros imunocomprometidos (Lewis, Viale, & Kontoyiannis, 2012). Para além das candidoses superficiais (cutâneas e mucocutâneas), estes fungos poderão alcançar a corrente sanguínea (candidemia) e/ou atingir tecidos profundos (candidose invasiva). A candidose sistémica poderá ocorrer por inoculação directa num local estéril ou por disseminação hematogénica (Clancy & Nguyen, 2013). Neste contexto, existem diferentes tipos de candidose invasiva (CI), os quais devem ser tidos em consideração aquando do diagnóstico laboratorial.

De acordo com dados epidemiológicos, apesar de *C. albicans* ser considerada a espécie com maior patogenicidade do género e com maiores taxas de isolamento, assiste-se à emergência de espécies de CNA, sendo *Candida glabrata* (*C. glabrata*), *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*), *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) e *Candida krusei* (*C. krusei*) as espécies mais prevalentes (Deorukhkar & Saini, 2015a; Kołaczowska & Kołaczowski, 2016; Papon, Courdavault, Clastre, & Bennett, 2013).

Actualmente, o tratamento das infecções fúngicas invasivas representa um grande desafio na prática clínica, pelo que a instituição atempada de uma terapêutica apropriada contribui para um bom prognóstico destas infecções (Kauffman, 2016b). Os fármacos antifúngicos (AF) disponíveis para terapêutica dividem-se em quatro classes consoante o mecanismo de acção: azóis, equinocandinas, polienos e análogos de nucleótidos (Sardi, Scorzoni, Bernardi, Fusco-Almeida, & Mendes Giannini, 2013).

A limitação de agentes AF existentes torna fundamental a execução de um correcto diagnóstico, onde os testes de susceptibilidade aos antifúngicos (TSAF) *in vitro* auxiliam na instituição de uma terapêutica efectiva, evitando-se o desenvolvimento de resistências e consequente emergência de espécies resistentes (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014; Giolo & Svidzinski, 2010). Actualmente, ainda que semelhantes, existem duas directrizes para testar a susceptibilidade aos AF: *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (Pappas et al., 2015).

Deste modo, a escolha da terapêutica, para além de ter em conta os padrões de resistência/susceptibilidade aos AF, deverá ser feita com base nos factores de risco do doente e comorbilidades, estado imunológico do hospedeiro, terapêuticas anteriormente instituídas (se aplicável) e características do fármaco tais como a sua biodisponibilidade, espectro de actividade, parâmetros farmacocinéticos, farmacodinâmicos, toxicidades associadas e custo (Ashley, Lewis, Lewis, Martin, & Andes, 2006; Patil, Rao, Majumdar, & Anil, 2015; Póvoa & Gonçalves-Pereira, 2011).

As espécies de CNA são importantes agentes de infecções nosocomiais, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos, representando um grave problema dado a sua prevalência, efeitos iatrogénicos, elevados custos e taxas de morbilidade e mortalidade associadas (Perlroth, Choi, & Spellberg, 2007; Viriato, 2014). Por conseguinte, a sua prevenção deverá ser tida em consideração pelos profissionais de saúde, sendo uma

medida eficaz a correcta e assídua utilização da técnica de lavagem das mãos (Viriato, 2014).

No âmbito desta monografia serão evidenciados os factores que estão na origem da emergência das espécies de CNA. Ao longo do trabalho será dado especial ênfase às CI que, apesar de ocorrerem com menor frequência que as candidoses superficiais, assumem-se como importantes agentes de infecções nosocomiais e constituem as micoses sistémicas com maiores taxas de mortalidade associadas, acarretando problemas que colocam em causa a salvaguarda da saúde pública (Giolo & Svidzinski, 2010; Peixoto, Rocha, Nascimento, Moreira, & Kashiwabara, 2014; Sobel, 2015).

2. *Candida* spp.

2.1. Biologia e Taxonomia

O género *Candida* engloba cerca de 200 espécies, sendo apenas 15 reconhecidas como agentes patogénicos (Brandt & Lockhart, 2012; Yapar, 2014). *Candida* spp. é classificada taxonomicamente como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação taxonómica de *Candida* spp. (Adaptado de Deorukhkar & Saini, 2015a; Giolo & Svidzinski, 2010).

Reino	<i>Fungi</i>
Divisão	Eumycota
Subdivisão	Deuteromycotina
Filo	Ascomycota
Classe	Deuteromycetes
Ordem	Cryptococcales
Família	<i>Cryptococcaceae</i>
Género	<i>Candida</i>

As espécies de *Candida* são ubiqüitárias, crescendo tanto em aerobiose como em anaerobiose, e podem desencadear infecções localizadas ou sistémicas (Giolo & Svidzinski, 2010). Estes fungos fazem parte da constituição microbiológica normal de diversas regiões anatómicas, podendo colonizar o trato gastrointestinal, trato genitourinário, trato respiratório, cavidade oral e pele (Giolo & Svidzinski, 2010; Kabir, Hussain, & Ahmad, 2012; Paramythiotou, Frantzeskaki, Flevvari, Armaganidis, & Dimopoulos, 2014; Silva et al., 2012; Yapar, 2014).

Geralmente, *Candida* spp. reproduz-se assexuadamente, apesar de também se observarem formas de reprodução sexuada (Giolo & Svidzinski, 2010). Geneticamente, *C. tropicalis* é a espécie que mais se assemelha com *C. albicans*, contrastando com *C. glabrata* que, dado o seu genoma haplóide, é a espécie que mais difere (Butler et al., 2009). De facto, *C. glabrata* apresenta mais semelhanças com *Saccharomyces cerevisiae* do que com outras espécies do seu género (Brandt & Lockhart, 2012).

Morfológicamente, consoante a espécie em causa, poderão apresentar três formas distintas: leveduriforme, hifa e/ou pseudo-hifa (Figura 1) (Thompson, Carlisle, & Kadosh, 2011).

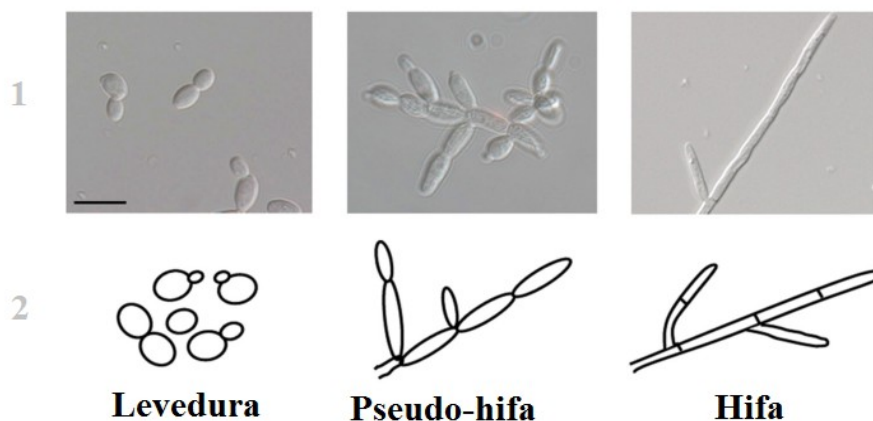


Figura 1. Morfologias de *C. albicans*. (1) Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial. (2) Ilustração. (Retirada e adaptada de Thompson et al., 2011).

Todas as espécies têm a capacidade de crescer na sua forma leveduriforme por gemulação, originando os blastoconídios, estruturas com forma redonda a oval e tamanho compreendido entre $2-5 \times 3-7 \mu\text{m}$ (Silva et al., 2012).

Por outro lado, a morfologia das formas filamentosas é influenciada pelo seu modo de formação (Silva et al., 2012). Enquanto as hifas verdadeiras se desenvolvem a partir de uma estrutura inicial, o tubo germinativo, e o citoplasma se encontra dividido por septos (invaginações da parede celular que dividem as hifas em compartimentos), as pseudo-hifas formam-se por gemulação a partir da célula leveduriforme, verificando-se a ausência de septos, em que as gémulas formadas não se destacam da célula-mãe, reflectindo-se num protoplasma contínuo (Deorukhkar & Saini, 2015a; Silva et al., 2012).

C. albicans e *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*) são espécies dimórficas e filogeneticamente semelhantes, que têm a capacidade de formação de hifas verdadeiras e pseudo-hifas (Thompson et al., 2011). A formação de tubo germinativo é um factor de diferenciação, uma vez as duas espécies anteriormente referidas têm a capacidade de o produzir (Silva et al., 2012). Pelo contrário, *C. glabrata* apenas se apresenta na sua forma leveduriforme – blastoconídios (Silva et al., 2012). As morfologias que as espécies de *Candida* poderão apresentar encontram-se especificadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características morfológicas das espécies de *Candida*. (Adaptado de Silva et al., 2012; Thompson et al., 2011; Whibley & Gaffen, 2015).

Espécie	Morfologia
<i>C. albicans</i>	Levedura, pseudo-hifa e hifa
<i>C. dubliniensis</i>	Levedura, pseudo-hifa e hifa
<i>C. tropicalis</i>	Levedura, pseudo-hifa e hifa
<i>C. parapsilosis</i>	Levedura e pseudo-hifa
<i>C. guilliermondii</i>	Levedura e pseudo-hifa
<i>C. lusitaniae</i>	Levedura e pseudo-hifa
<i>C. krusei</i>	Levedura e pseudo-hifa
<i>C. glabrata</i>	Levedura

2.2. Epidemiologia

Numa perspectiva histórica, 70-80% dos isolamentos das infecções fúngicas por *Candida* correspondiam a *C. albicans*, ao passo que raramente eram isoladas espécies de CNA (Deorukhkar & Saini, 2015a). Desde a década de 80 que se assiste a uma mudança na epidemiologia destas infecções, verificando-se uma emergência das espécies não-*albicans*, apesar de *C. albicans* ser ainda a mais prevalente (Deorukhkar & Saini, 2015a; Sardi et al., 2013).

Das CNA, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* são as mais frequentemente reportadas (Deorukhkar et al., 2014a; Yapar, 2014). A taxa de mortalidade média associada é de 50% (30-80%), 29% e 40% (30-70%) para *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, respectivamente (Kołaczkowska & Kołaczkowski, 2016).

Segundo Williams e Lewis (2011), as candidoses mucocutâneas ocorrem com maior regularidade. Neste sentido, os locais onde é mais frequente o isolamento de *Candida* correspondem à cavidade oral e trato genitourinário, sendo diagnosticadas infecções em cerca de 31-35% de indivíduos saudáveis (Silva et al., 2012). *Candida spp.* é actualmente a segunda causa de infecções vaginais, sendo que 75% das mulheres sofrem um episódio durante a idade fértil, e 40-50% poderão ter o segundo episódio. Apesar de em 80-90% dos casos ser causada por *C. albicans*, assiste-se à emergência de espécies de CNA, sendo 10-20% dos casos atribuídos a *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C.*

krusei, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (Bhawna, Sangeeta, & Udayan, 2015; Milhomens, Machado, Moraes, Borges, & Diniz, 2014). A colonização da cavidade orofaríngea atinge cerca de 30-55% dos jovens adultos saudáveis (Sobel, 2015). Ao contrário das infecções invasivas, as candidoses mucocutâneas são comuns nos doentes VIH/SIDA (Papon et al., 2013; Sobel, 2015).

Em indivíduos com o sistema imunitário muito debilitado, poderão desenvolver-se infecções sistémicas, as quais se revestem de grande importância clínica dado as elevadas taxas de mortalidade associadas – 71-79% (Patil et al., 2015). A incidência anual de CI é de 6-23/100 000 indivíduos nos Estados Unidos da América e de 2.53-11/100 000 indivíduos nos países Europeus. Num relatório global, verificou-se um incremento de 10-11% nos casos de candidemia, num período de 6,5 anos (Patil et al., 2015).

Candida spp. é apontada como responsável pela crescente incidência de casos de septicemia nos hospitais (Giolo & Svidzinski, 2010; Oren & Paul, 2014), estando classificada nos Estados Unidos entre a terceira ou quarta causa de infecções nosocomiais (Deorukhkar & Saini, 2016). Estas infecções são mais comuns nas UCI, visto ser onde se encontram doentes mais vulneráveis e sujeitos a um maior número de processos terapêuticos invasivos (Viriato, 2014). Na UCI a taxa de mortalidade associada a CI é cerca de 30-50% (Vazquez, 2010; Zarrin & Mahmoudabadi, 2009). Segundo Sobel (2015), 10-12% de todas as infecções nosocomiais são provocadas por *Candida*, e 8-15% das infecções nosocomiais que afectam a corrente sanguínea são provocadas por espécies deste género.

A distribuição das diferentes espécies varia consoante a população em estudo (idade) e respectiva região geográfica, bem como doenças subjacentes ao hospedeiro e terapêuticas instituídas, podendo ainda ocorrer variações entre hospitais de uma mesma região e entre as diversas unidades hospitalares (Deorukhkar & Saini, 2015a; Guinea, 2014). Este facto foi demonstrado num estudo de Falagas, Roussos e Vardakas (2010), em que a prevalência de *C. albicans* e das espécies de CNA em amostras sanguíneas de pacientes em internamento variava de acordo com as regiões geográficas. Enquanto *C. albicans* foi predominantemente isolada no Norte, Centro da Europa e Estados Unidos da América, as espécies de CNA foram principalmente isoladas no Sul da Europa, América do Sul e Ásia.

2.2.1. Epidemiologia em Portugal

A caracterização epidemiológica das infecções por *Candida* em Portugal é difícil de determinar uma vez que os estudos existentes são escassos. A avaliação epidemiológica de infecções cutâneas/mucocutâneas em Portugal é igualmente escassa, merecendo futuras investigações.

Num estudo epidemiológico realizado em Portugal, num hospital no Porto, com duração de doze meses, evidenciou-se uma incidência de fungemia de 2,7 casos em cada 1000 admissões hospitalares, estando-lhe associada uma taxa de mortalidade de 39,3%, onde *C. albicans* (35%) foi a espécie mais isolada, seguida de *C. parapsilosis* (25,6%) (Costa-de-Oliveira, Pina-Vaz, Mendonça, & Gonçalves Rodrigues, 2008).

Num estudo posterior, realizado por Sabino et al. (2010), foi avaliada a incidência de candidemia num Hospital oncológico Português durante seis anos. Em 119 isolados, observou-se uma maior incidência de *C. albicans* (48.7%), seguida de *C. parapsilosis* (20.2%), *C. tropicalis* (8.4%), *C. krusei* (6.7%) e *C. glabrata* (5.0%), com uma taxa de mortalidade total de 58.2%.

O primeiro estudo português multicêntrico, observacional e descritivo foi realizado durante doze meses em dez hospitais de Portugal, onde se verificou uma incidência de 0,88 casos por cada 1000 admissões hospitalares, correspondendo *C. albicans* (40%) à espécie mais prevalente, seguindo-se *C. parapsilosis* (23%) e *C. glabrata* (13%) (Faria-Ramos et al., 2014). A taxa de mortalidade foi de 25%, sendo esta mais incidente em casos de *C. glabrata*, dando este estudo destaque à emergência de espécies não-*albicans* (Faria-Ramos et al., 2014).

2.3. Factores de risco do hospedeiro

Apesar de *C. albicans* se apresentar como a espécie mais patogénica do género, tem-se verificado o isolamento de outras espécies não-*albicans* identificadas como agentes infecciosos: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *Candida kefyr* (*C. kefyr*), *Candida norvegensis* (*C. norvegensis*), *Candida rugosa* (*C. rugosa*), *Candida guilliermondii* (*C. guilliermondii*), *Candida lusitaniae* (*C. lusitaniae*), *Candida famata* (*C. famata*), *Candida inconspícua* (*C. inconspícua*), *Candida lipolytica* (*C. lipolytica*) e *Candida pelliculosa* (*C. pelliculosa*) (Silva et al., 2012; Yapar, 2014).

Neste sentido, emerge a necessidade de identificar os factores de risco do hospedeiro numa primeira fase do diagnóstico (Paramythiotou et al., 2014). Na Tabela 3 estão enumerados os factores relacionados com o hospedeiro que predis põem o desenvolvimento dos diferentes tipos de candidoses superficiais.

Tabela 3. Factores de risco/predisponentes ao desenvolvimento de candidose cutânea/mucocutânea. (Adaptado de Fukushima et al., 2005; Kauffman, 2008, 2016a; Patil et al., 2015; Peixoto et al., 2014).

Infecção	Factores de risco/predisponentes de candidose cutânea/mucocutânea
Candidose Orofaríngea	<ul style="list-style-type: none"> - Extremos de idade - Utilização de prótese dentária, falta de higienização e mau ajuste da mesma - Terapêuticas com corticoesteróides inalados ou antibióticos de largo espectro - VIH/SIDA, Diabetes <i>mellitus</i>, deficiências nutricionais, neutropenia, xerostomia
Esofagite	<ul style="list-style-type: none"> - Doenças endócrinas - Candidose orofaríngea
Vulvovaginite	<ul style="list-style-type: none"> - Gravidez - Diabetes <i>mellitus</i> ou VIH/SIDA - Contracepção oral ou antibióterapia
Balanite	<ul style="list-style-type: none"> - Diabetes <i>mellitus</i> - Antibióterapia recente - Secreções vaginais por contacto sexual
Mastite	<ul style="list-style-type: none"> - Mulheres em período de amamentação
Candidose mucocutânea crónica (CMC)	<ul style="list-style-type: none"> - Endocrinopatias - Disfunção dos linfócitos T-helper
Candidoses das unhas	<ul style="list-style-type: none"> - Sexo feminino - Diabetes <i>mellitus</i> - Traumatismos - Contacto frequente com água
Candidose intra-uterina	<ul style="list-style-type: none"> - Vaginite intensa
Cistite	<ul style="list-style-type: none"> - Cateter urinário
Intertrigo	<ul style="list-style-type: none"> - Obesidade - Contacto frequente com água

A imunossupressão do hospedeiro poderá levar ao desenvolvimento de infecções sistêmicas, cujos factores predisponentes se encontram enumerados na Tabela 4.

Tabela 4. Factores de risco para o desenvolvimento de CI. (Adaptado de Deorukhkar, Saini, & Mathew, 2014a; Kauffman, 2008; Leroy et al., 2009; Luzzati et al., 2013; Muskett et al., 2011; Paramythiotou et al., 2014; Perlroth et al., 2007; Viriato, 2014).

Factores de Risco para o desenvolvimento de CI	
Epidemiológicos	Má nutrição Prematuridade, baixo peso à nascença ou idade avançada
Iatrogénicos	Tratamento com corticosteróides, fármacos antifúngicos, agentes imunossupressores e antibióticos de largo espectro Intervenções cirúrgicas, nomeadamente cirurgia gastrointestinal Cirurgia oftálmica (remoção de cataratas) Sonda vesical Ventilação mecânica (> 48h) Hospitalização prolongada, nomeadamente na UCI Cateter venoso central Nutrição parentérica total Transplante de órgãos Quimioterapia, radioterapia, hemodiálise Injecções intra-articulares
Doença	Neoplasia de órgãos ou hematológica Malformações congénitas Diabetes <i>mellitus</i> Insuficiência renal crónica Colonização ou infecção recorrente por <i>Candida</i> Pancreatite aguda severa Neutropenia (<500 neutrófilos/mm ³) Infecção VIH/SIDA

Actualmente, destacam-se a epidemia do VIH ou doenças cancerígenas como factores de risco preponderantes na emergência das espécies de CNA. Estes contextos clínicos, ou outros factores epidemiológicos ou iatrogénicos, variáveis entre as diferentes espécies, aumentam o risco de infecção por *Candida* (Tabela 5) (Deorukhkar & Saini, 2015b; Farmakiotis, Kyvernitakis, Tarrand, & Kontoyiannis, 2015).

Tabela 5. Características e factores de risco/predisponentes responsáveis pela emergência das espécies de CNA. (Retirado e adaptado de Deorukhkar & Saini, 2015a; Kaur, Dhakad, Goyal, Bhalla, & Dewan, 2016; Kołaczowska & Kołaczowski, 2016; Paramythiotou et al., 2014).

Espécie	Factores de risco/ predisponentes		
	Epidemiológicos	Iatrogénicos	Doença subjacente
<i>C. glabrata</i>	Idade avançada	Profilaxia com FCZ, exposição prévia a equinocandinas, receptores de transplante de medula óssea, transplante de órgãos sólidos, cirurgia abdominal, terapêutica antibiótica, utilização de corticóides, NPT ¹ e CVC ²	Tumores sólidos, patologias hemato-oncológicas, disfunção renal, Diabetes <i>mellitus</i> , VIH/SIDA
<i>C. parapsilosis</i>	Prematuridade, crianças e jovens (1-19 anos)	Presença de dispositivo intravascular, NPT ¹ , receptores de transplante de medula óssea, infecções nosocomiais, formação de biofilmes em CVC ² , antibioterapia prévia, terapêuticas imunossupressoras	Neutropenia, queimaduras
<i>C. tropicalis</i>	Idade avançada	Internamento em UCI, cateterização prolongada, NPT ¹ , quimioterapia, terapêutica com antibióticos de largo espectro	Neutropenia, doença maligna (leucemia), VIH/SIDA
<i>C. krusei</i>	Faixa etária neonatal	Profilaxia com FCZ, receptores de transplante de medula óssea, internamento em UCI, cirurgia gastrointestinal recente	Leucemia, neutropenia, VIH/SIDA
<i>C. guilliermondii</i>	ND ³	Receptores de transplante de medula óssea, cateteres intravasculares	Doença maligna
<i>C. lusitaniae</i>	ND ³	Terapêutica com antibióticos de largo espectro, receptores de transplante de medula óssea	ND ³
<i>C. dubliniensis</i>	ND ³	ND ³	VIH/SIDA, neutropenia

¹ NPT – Nutrição parentérica total

² CVC – Cateter venoso central

³ ND – Informação não disponível

2.4. Factores de virulência

Candida spp. possui diversos factores de virulência, entre os quais se podem destacar a capacidade de adesão aos tecidos do hospedeiro e a sua consequente capacidade de invasão e formação de biofilmes, a secreção de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a célula hospedeira (proteínases, fosfolipases, lipases e hemolisinas), o dimorfismo morfológico e alterações fenotípicas (Figura 2).

Todos os factores supramencionados podem apresentar variações na sua expressão, dependendo da espécie em causa e da sua origem geográfica, do hospedeiro e do tipo, local e estadió da infecção (Deorukhkar, Saini, & Mathew, 2014b). De acordo com Giolo e Svidzinski (2010), estes factores podem actuar em sinergia no estabelecimento do processo infeccioso.

Existem também diversos mecanismos de adaptação celular que contribuem para a patogenicidade de *Candida* e sobrevivência na célula hospedeira (De Rossi et al., 2011; Giolo & Svidzinski, 2010; Mayer et al., 2013; Sardi et al., 2013; Silva et al., 2012).

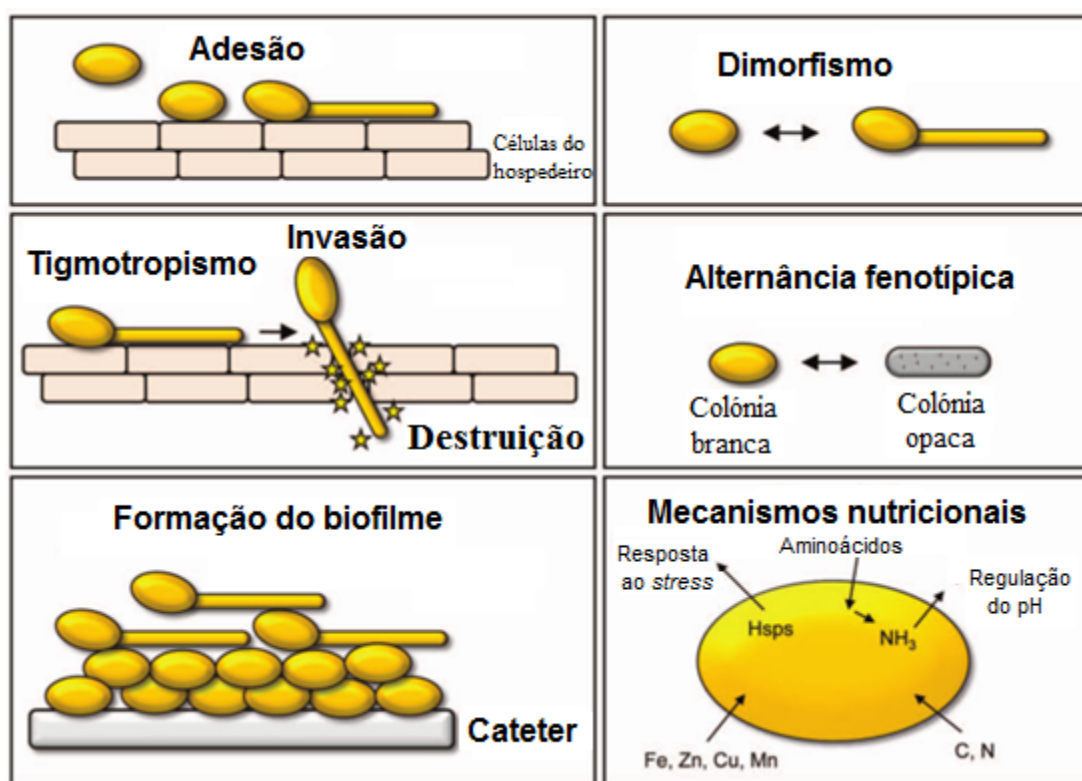


Figura 2. Mecanismos de patogenicidade de *C. albicans*. (Retirada e adaptada de Mayer et al., 2013).

Apesar da sua emergência, ainda são poucos os estudos que evidenciam os factores de virulência das CNA (Deorukhkar & Saini, 2015a; Silva et al., 2012), sendo por isso *C. albicans* a espécie utilizada como modelo para o estudo dos diferentes processos e factores que participam na interacção entre o microrganismo e a célula hospedeira (Papon et al., 2013).

2.4.1. Adesão

Os mecanismos de reconhecimento da célula hospedeira permitem a adesão de *Candida*, iniciando-se deste modo o processo infeccioso (Brunke & Hube, 2013; De Rossi et al., 2011). Este depende da expressão de diversos genes, como também das condições ambientais do hospedeiro, da espécie e da relação estabelecida entre ambos (Modrzewska & Kurnatowski, 2015; Wang, Huang, Lan, & Chen, 2012).

A adesão é mediada por proteínas específicas – adesinas – localizadas na parede celular fúngica, bem como por factores inespecíficos, onde se incluem propriedades físico-químicas como a hidrofobicidade, forças electrostáticas e de Van der Waals e pontes de hidrogénio (Giolo & Svidzinski, 2010; Silva et al., 2012).

As adesinas conferem ao microrganismo a capacidade de aderir tanto a superfícies bióticas, designadamente os aminoácidos e açúcares presentes na superfície celular do hospedeiro, como a materiais abióticos, de que são exemplos os dispositivos médicos hospitalares ou as próteses dentárias (Sardi et al., 2013). Estas proteínas desempenham ainda um papel fundamental na formação dos biofilmes (Brunke & Hube, 2013).

No caso de *C. albicans*, a *ALS* (*agglutinine-like sequence*) é uma família de oito genes que codificam glicoproteínas (adesinas) com capacidade de aderir à célula hospedeira e a outros microrganismos, podendo desencadear infecções mistas (Modrzewska & Kurnatowski, 2015).

Segundo os mesmos autores, a sua expressão vai depender, entre outros factores, da morfologia da espécie fúngica, não tendo sido identificadas em *C. glabrata*. Nesta espécie, uma outra família de genes, genes *EPA*, codifica as proteínas Epa (*epithelial adhesin*), principais responsáveis pelo processo de adesão às células epiteliais (Brunke & Hube, 2013; Modrzewska & Kurnatowski, 2015). Já em *C. tropicalis*, foram reportadas três proteínas Als, em *C. parapsilosis* cinco proteínas Als e seis Pga (outras

proteínas de membrana) e em *C. dubliniensis* as adesinas são codificadas por um gene semelhante ao de *C. albicans*, podendo apresentar diferenças na sua regulação (Silva et al., 2012; Sullivan et al., 2004).

2.4.2. Biofilme

Um biofilme é uma associação organizada de comunidades de células, geralmente incorporadas numa matriz extracelular (Sardi et al., 2013). Os biofilmes de *Candida* podem ser constituídos por células de diferentes morfologias: hifas e células leveduriformes (blastoconídios), excepto os de *C. glabrata*, constituídos apenas por blastoconídios (Finkel & Mitchell, 2011; Rodrigues, Silva, & Henriques, 2014; Sardi et al., 2013).

Como se pode ver na Figura 3, a sua formação pode ser sintetizada em quatro passos: adesão, iniciação, maturação e dispersão (Finkel & Mitchell, 2011).

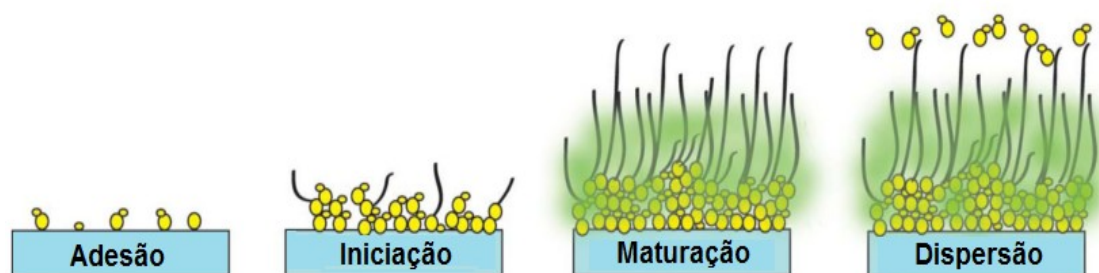


Figura 3. Etapas no processo de formação de um biofilme. (Retirada e adaptada de Finkel & Mitchell, 2011).

Numa fase inicial, a adesão das células leveduriformes a um substrato é possibilitada pela ocorrência de processos físico-químicos e pela presença de adesinas (Brunke & Hube, 2013; Giolo & Svidzinski, 2010). Posteriormente, no passo de iniciação, a proliferação das células leveduriformes e formação dos tubos germinativos reflectem-se na formação de estruturas filamentosas – hifas e/ou pseudo-hifas – na parte superficial do biofilme (Finkel & Mitchell, 2011; Mayer et al., 2013). Seguidamente, com a maturação do biofilme dá-se a acumulação dos constituintes que formam a matriz extracelular, tornando-se assim a sua estrutura mais resistente à terapêutica antifúngica. As células não aderentes libertam-se para o meio envolvente, podendo colonizar outras superfícies (Finkel & Mitchell, 2011).

Muitos são os factores que afectam a sua formação e estrutura, nomeadamente o pH do meio ambiente e a quantidade de oxigénio presente, bem como a espécie e estirpe de *Candida* (Al-Fattani & Douglas, 2006; Sardi et al., 2013; Silva et al., 2012). A componente genética é também fundamental já que alguns genes, ao codificarem proteínas específicas da parede celular, influenciam o processo de adesão ao substrato ou a outras células (Finkel & Mitchell, 2011).

Das espécies de CNA, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* são aquelas que apresentam a capacidade de formar biofilmes, sendo o de *C. dubliniensis* idêntico ao de *C. albicans*, cuja matriz é composta por hidratos de carbono, proteínas, fósforo e hexosaminas. As características dos biofilmes variam consoante a espécie, como exposto na Tabela 6 (Deorukhkar & Saini, 2015a).

Tabela 6. Características dos biofilmes de *Candida* spp. e principais genes reguladores. (Adaptado de Deorukhkar & Saini, 2015a; Kołaczowska & Kołaczowski, 2016; Silva et al., 2012).

Espécie	Composição da matriz	Genes	Capacidade de formação	Forma
<i>C. tropicalis</i>	Menor quantidade de hidratos de carbono que <i>C. albicans</i>	<i>BCR1</i>	Elevada	Monocamada compacta
<i>C. glabrata</i>	Elevada quantidade de proteínas e hidratos de carbono	<i>BCR1</i>	Moderada	“Tapete”
<i>C. parapsilosis</i>	Maioritariamente constituída por hidratos de carbono (baixa quantidade de proteínas)	<i>BCR1</i> <i>CPH2</i>	Elevada	Monocamada ou múltiplas camadas

Segundo Deorukhkar et al. (2014a), *C. tropicalis*, quando comparada com *C. albicans*, tem uma maior aptidão para a formação de biofilmes. Por sua vez, *C. parapsilosis* apresenta elevada aptidão para a formação de biofilmes em superfícies plásticas abióticas (cateteres e materiais de prótese) bem como em meios ricos em glucose e lípidos (Bujdaková, 2016; Kołaczowska & Kołaczowski, 2016). Já os biofilmes de *C. glabrata*, comparativamente aos das restantes espécies de CNA, apresentam actividade metabólica reduzida (Rodrigues et al., 2014).

2.4.3. Morfogénese

Algumas espécies de *Candida* apresentam a capacidade de alternância reversível entre a forma leveduriforme (crescimento isotrópico) e a filamentosa, hifa e/ou pseudo-hifa (crescimento apical), consoante as condições de temperatura e pH do meio ambiente – capacidade de dimorfismo (Giolo & Svidzinski, 2010; Sardi et al., 2013). A capacidade de alternância para a forma de hifa é considerada um mecanismo de virulência que aumenta a patogenicidade de *Candida*, nomeadamente de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*, conferindo-lhes uma maior resistência à fagocitose e facilitando a invasão da célula hospedeira (Sardi et al., 2013; Silva et al., 2012).

A morfogénese de *C. albicans* envolve a expressão de genes, nomeadamente o gene *HGC1* que, de acordo com Thompson et al. (2011), está directamente implicado na indução da forma filamentosa e consequente patogenicidade. Muitas são também as proteínas implicadas na indução da forma micelial de *C. albicans*, nomeadamente as proteínas Hwp1, Als3, Sap4, Sap5, Sap6, Ecel e Hyr1 (Mayer et al., 2013). A alternância de morfologia é também controlada por mecanismos de transdução de sinal e reguladores de transcrição (Thompson et al., 2011).

Tal como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* estão associadas, devido à capacidade de formação de hifas, a uma maior capacidade de adesão e invasão subsequente. Pelo contrário, de acordo com Brunke e Hube (2013), a virulência de *C. glabrata* não depende da sua morfologia.

2.4.4. Enzimas

As enzimas hidrolíticas extracelulares representam o factor de virulência com maior relevância na infecção por *Candida*, já que estas degradam a célula hospedeira, facilitando a sua colonização e consequente estabelecimento da infecção (Deorukhkar & Saini, 2013).

Neste grupo incluem-se as aspartil proteinases (Saps), fosfolipases, lipases, e hemolisinas, sendo as proteases e fosfolipases as de maior relevância (Deorukhkar et al., 2014b; Sardi et al., 2013; Silva et al., 2012). Uma vez que *C. albicans* é considerada a mais patogénica, existem por conseguinte mais estudos centrados nesta espécie (Moran, Coleman, & Sullivan, 2012).

As proteases contribuem para a patogenicidade, já que são responsáveis pela degradação da queratina, colagénio e mucina, proteínas que constituem as membranas epitelial e mucosa da célula hospedeira (Deorukhkar et al., 2014b), e degradam também componentes de defesa do sistema imunológico, como as imunoglobulinas, complemento e citocinas, afectando a imunidade do hospedeiro (Deorukhkar et al., 2014b; Giolo & Svidzinski, 2010; Williams & Lewis, 2011).

Em *C. albicans*, a actividade proteolítica é levada a cabo por uma família de isoenzimas. Estas são codificadas pelos genes *SAP1-10*, sendo que as proteínas codificadas pelos genes *SAP1-6* promovem a adesão e degradação da célula hospedeira, afectando a resposta imunitária, e aquelas que são codificadas pelos genes *SAP9-10* estão expostas na parede celular do microrganismo, preservando a integridade da célula patogénica (De Rossi et al., 2011; Sardi et al., 2013). As Saps têm um comportamento heterogéneo no que respeita ao pH ambiental, o que lhes permite sobreviver em diferentes condições (Williams & Lewis, 2011).

Num estudo conduzido por Deorukhkar et al. (2014b), *C. albicans* demonstrou ser a espécie com maior actividade proteolítica, embora esta se tenha verificado também em espécies de CNA, entre elas *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* (Deorukhkar & Saini, 2015a; Deorukhkar & Saini, 2013; Sardi et al., 2013; Staniszewska et al., 2012).

De acordo com Silva et al. (2012), foram identificados 3 genes que codificam Saps (*SAPPI-SAPP3*) em *C. parapsilosis*, pelo menos 4 genes que codificam Saps em *C. tropicalis* (*SAPT1-SAPT4*) e um tipo de Sap, não especificado, de *C. glabrata*. No caso de *C. dubliniensis*, estão descritos 8 genes que codificam Saps (Whibley & Gaffen, 2015).

As fosfolipases (PLs) são proteínas que hidrolisam as ligações éster dos fosfolípidos da membrana da célula hospedeira, transformando-os em ácidos gordos e destruindo assim a célula hospedeira ao exporem os receptores de membrana, facilitando os processos de adesão e invasão (Deorukhkar & Saini, 2015a; Deorukhkar et al., 2014a; Silva et al., 2012; Williams & Lewis, 2011).

Foram identificados 7 genes que codificam fosfolipases: *PLA*, *PLB1*, *PLB2*, *PLC1*, *PLC2*, *PLC3* e *PLD1* (Sardi et al., 2013; Williams & Lewis, 2011). *C. parapsilosis*, *C.*

glabrata, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* são as espécies não-*albicans* onde se observou a existência de actividade fosfolipídica (Deorukhkar & Saini, 2015a).

As lipases são responsáveis pela hidrólise dos triacilgliceróis para a obtenção de nutrientes. Estas facilitam também a adesão à célula hospedeira e desencadeiam processos inflamatórios ao afectarem o sistema imunitário (Sardi et al., 2013).

Tanto *C. albicans* como a maioria das espécies de CNA têm a capacidade de produzir hemolisinas, factor hemolítico essencial que culmina com a lise dos eritrócitos da célula do hospedeiro e, consequentemente, com a obtenção de ferro por parte destes microrganismos (Rodrigues et al., 2014; Sardi et al., 2013; Silva et al., 2012).

O ferro é um elemento inorgânico essencial para o desenvolvimento das diferentes espécies de *Candida*, já que permite que o microrganismo sobreviva na célula hospedeira (Sardi et al., 2013). Estas necessitam de o captar da célula hospedeira, onde se encontra normalmente no espaço intracelular ligado ao grupo heme ou em forma de ferritina, enquanto uma pequena quantidade se encontra associada a proteínas de transporte (lactoferrina e transferrina) (Giolo & Svidzinski, 2010).

2.4.5. Potencial oxidativo

As espécies reactivas ao oxigénio (ROS), quando em excesso, são responsáveis pela lesão das células, tecidos ou órgãos, levando a um processo inflamatório e criando um estado de *stress* oxidativo. As ROS poderão ter origem endógena, quando resultam de reacções metabólicas normais tais como produção mitocondrial de energia ou reacções de destoxificação. A origem também poderá ser exógena quando se trata de exposição a poluentes ambientais, radiações ionizantes ou de infecções fúngicas, bacterianas ou virais (Miraloglu, 2016).

Perante uma infecção fúngica, as células fagocíticas vão actuar em defesa do hospedeiro, produzindo ROS responsáveis pela degradação do microrganismo patogénico fagocitado (Miraloglu, 2016). Porém, alguns fungos patogénicos, nomeadamente *C. glabrata*, são tolerantes aos radicais livres e peróxidos, uma vez que possuem mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos antioxidantes, resistindo deste modo ao *stress* oxidativo (Miraloglu, 2016).

Assim sendo, os mecanismos celulares de resposta ao *stress* oxidativo apresentam-se como uma defesa de alguns fungos e um importante factor de virulência, já que aumentam a sua tolerância às ROS e asseguram a sua resistência ao *stress* oxidativo e sobrevivência no interior da célula de defesa do hospedeiro (Miraloglu, 2016).

2.4.6. *Switch* fenotípico

C. albicans apresenta também como factor de virulência a capacidade de *switch* fenotípico entre colónias geneticamente semelhantes – brancas e lisas ou opacas e de textura rugosa. As colónias diferem na sua patogenicidade e expressão genética, estando as opacas associadas à colonização cutânea e a uma maior susceptibilidade à fagocitose, enquanto as brancas são menos propensas a serem fagocitadas e se associam normalmente a casos de candidemia (Schell, 2015).

No que respeita às CNA, este mecanismo está descrito para *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, onde se encontram descritos diferentes fenótipos baseados na cor que apresentam em meio de cultura com Sulfato de Cobre (CuSO₄) (del Valle, 2015; Lastauskienė, Čepulytė, Girkontaitė, & Zinkevičienė, 2015; Tscherner, Schwarzmüller, & Kuchler, 2011).

2.5. Patogénese da infecção

Nas infecções por *Candida*, existem dois mecanismos possíveis de patogénese: endógeno ou exógeno (Figura 4). Nas infecções por via endógena, a transmissão deve-se ao carácter patogénico oportunista destes microrganismos em causar infecção em indivíduos imunocomprometidos. Por outro lado, estes poderão ser responsáveis por infecções por via exógena, como a disseminação através das mãos dos profissionais de saúde ou através de dispositivos médicos hospitalares (Giolo & Svidzinski, 2010; Paramythiotou et al., 2014; Sardi et al., 2013).

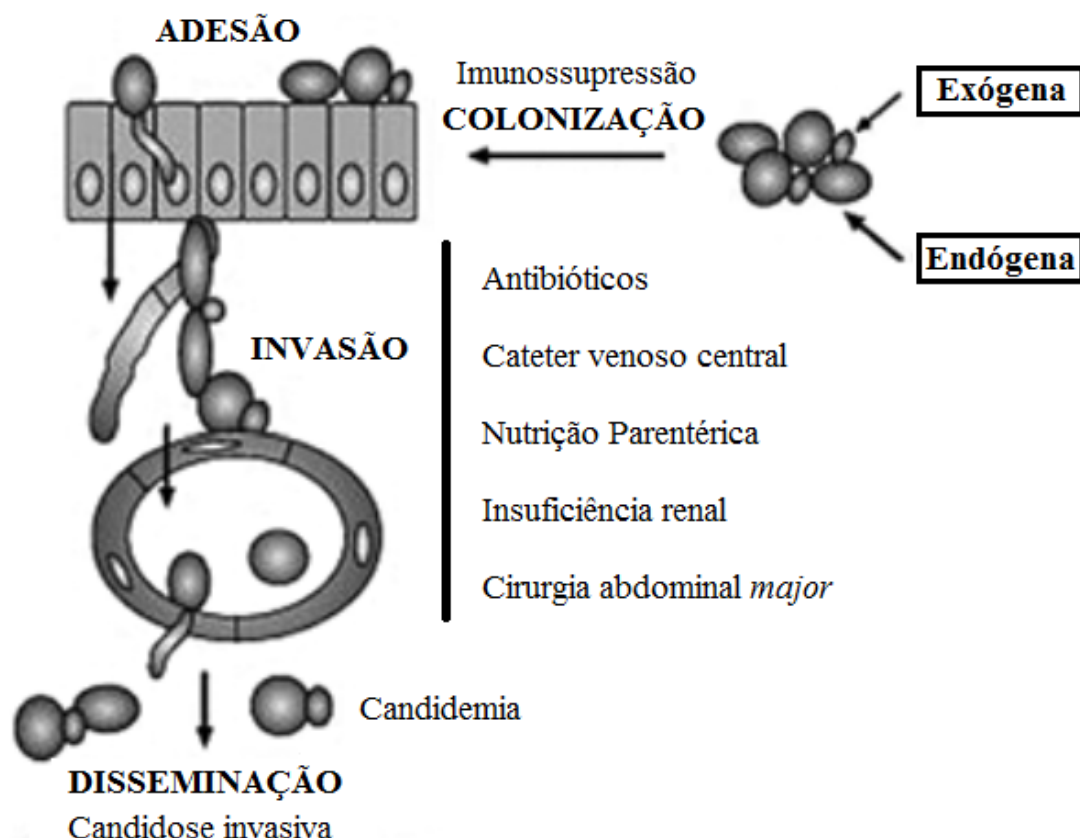


Figura 4. Mecanismos de patogênese da infecção por *Candida*. (Retirado e adaptado de Eggimann, Garbino, & Pittet, 2003; Mendes, 2012).

Para estabelecimento do processo infeccioso, terá que ocorrer a adesão à célula do hospedeiro e consequente invasão (por endocitose induzida ou penetração activa), sobrevivência, multiplicação do microrganismo e disseminação até à corrente sanguínea caso se trate de uma infecção sistémica (Figura 5) (Brunke & Hube, 2013; Silva et al., 2012; Wächtler et al., 2012), pelo que os casos de candidemia se encontram normalmente associados a períodos de hospitalização prolongados (Gómez, García-Vázquez, Hernández, Espinosa, & Ruiz, 2010).

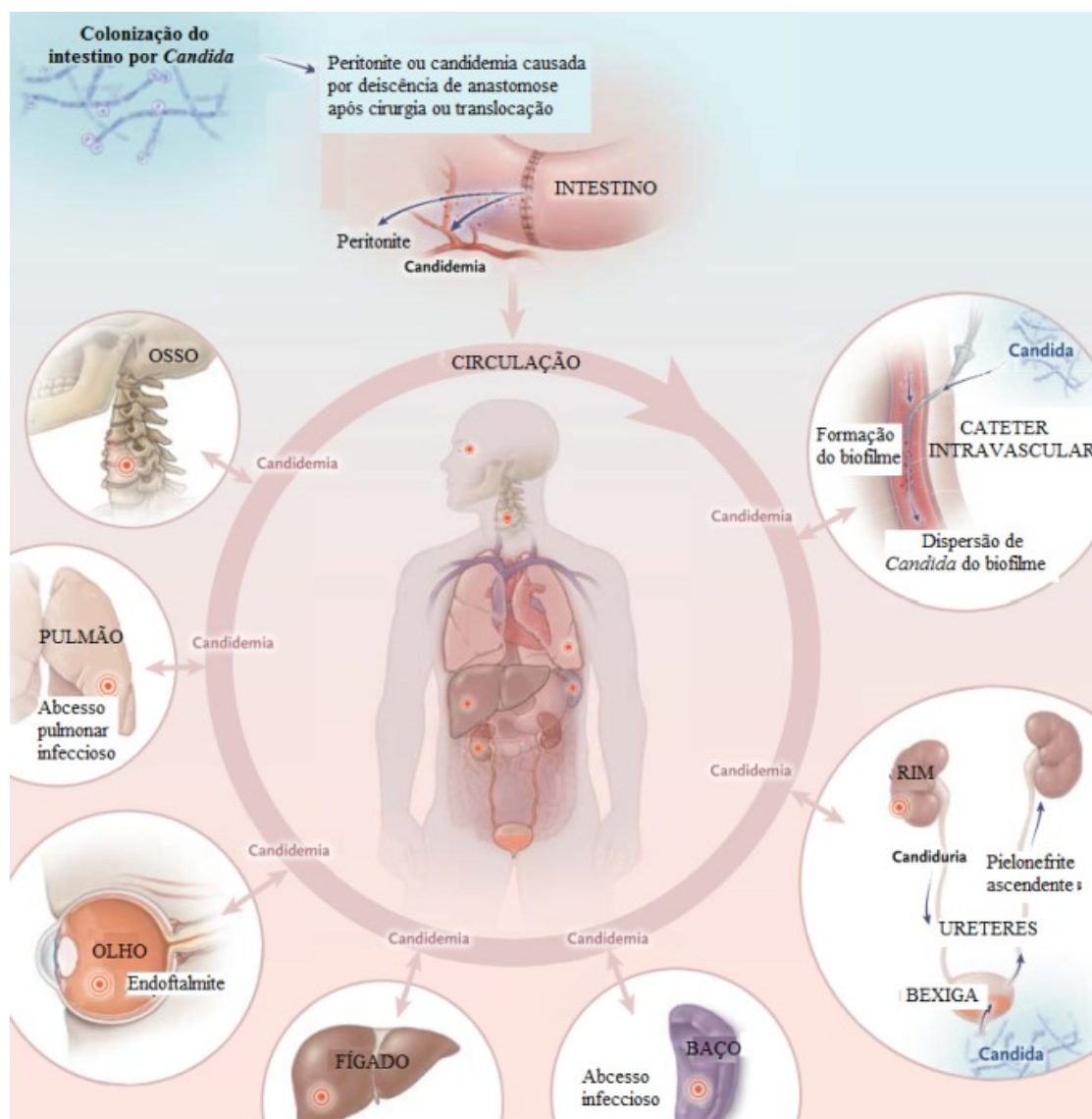


Figura 5. Patógenese da CI. (Retirada e adaptada de Kullberg & Arendrup, 2015).

Segundo Brunke e Hube (2013), *C. albicans* e *C. glabrata* são as duas espécies patogênicas mais comuns. No entanto, estudos revelam incerteza quanto ao modo de invasão da espécie leveduriforme até à corrente sanguínea, já que é a forma filamentosa que está associada à invasão da célula hospedeira. Os cateteres, nutrição parentérica e cirurgias são apontados como possíveis modos de disseminação da espécie leveduriforme (Jacobsen et al., 2012; Perlroth et al., 2007).

Em suma, num estudo em que se utilizou *C. albicans* como modelo, levado a cabo por Dalle et al. (2010), concluiu-se que o processo de adesão, invasão e destruição é influenciado por alguns factores, como o tipo de tecido ao qual vão aderir, o estado de diferenciação das células epiteliais, bem como a espécie de *Candida* em causa e a sua morfologia.

2.6. Resposta do Hospedeiro

Perante uma infecção por *Candida*, reveste-se de elevada importância o papel das células fagocíticas – neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas – na defesa do hospedeiro (Brown, 2011; Rodrigues et al., 2014). O tipo de candidose e respectiva dimensão são influenciados pela resposta do hospedeiro, pelo que os doentes com neutropenia são considerados de risco de candidose mucocutânea e invasiva, dado o reduzido número de neutrófilos circulantes (Lionakis & Netea, 2013).

A parede celular de *Candida* é constituída internamente por quitina e β -glucanos e, externamente, por glicoproteínas (mananos e manoproteínas) (Lewis et al., 2012). Estes polímeros de hidratos de carbono conferem à parede celular rigidez e protecção face às diferentes condições ambientais, embora a sua estrutura seja dinâmica, acompanhando as alterações morfológicas de algumas das espécies do género (Brown, 2011).

Os constituintes da parede celular fúngica, bem como o DNA e RNA, conhecidos como padrões moleculares associados ao agente patogénico (PAMPs), vão ser reconhecidos pelos receptores de reconhecimento padrão (PRR), nomeadamente os receptores *Toll-like* (TLRs) – TLR-2, TLR-4, TLR-7 e TLR-9 – e receptores de lecitina do tipo C (CLRs) – receptores de manose, dectina-1, dectina-2, entre outros – localizados na superfície das células fagocíticas que compõe o sistema imune inato – macrófagos, neutrófilos e células *natural killer* (NK) (Figura 6) (Brunke & Hube, 2013; Lionakis & Netea, 2013; Smekens, van de Veerdonk, Kullberg, & Netea, 2013; Voigt et al., 2014).



Figura 6. Principais PRR envolvidos no reconhecimento de *Candida*. (Retirada e adaptada de Lionakis & Netea, 2013).

Os PRR reconhecem a célula fúngica e ligam-se ao ligando correspondente (PAMP), promovendo a fagocitose. Posteriormente à fagocitose, dá-se a formação do fagossoma que, após a sua maturação por processos de fusão e fissão, dá origem ao fagolisossoma, estrutura esta com actividade antimicrobiana capaz de digerir o agente patogénico (Brown, 2011). São induzidas vias de sinalização intracelulares que levam à secreção de mediadores solúveis, como citocinas e quimiocinas, desencadeando-se uma resposta inflamatória (Brown, 2011). Assim, é de salientar o papel dos PRR na defesa do hospedeiro e modulação das respostas imune inata e adaptativa (Smeekens et al., 2013).

A emergência das infecções fúngicas assenta no facto dos agentes patogénicos adquirirem mecanismos de sobrevivência. Assim, existem estratégias desenvolvidas pelas espécies fúngicas que impedem o seu reconhecimento: mecanismos para “mascarar” os PAMPs e modulação da activação do sistema complemento, prevenindo a opsonização (Brown, 2011).

A capacidade de dimorfismo de algumas espécies de *Candida* poderá conduzir a modificações na parede celular fúngica, alterando-se os PAMPs, dificultando deste modo o reconhecimento do agente patogénico pelas células do sistema imunitário do hospedeiro (Lewis et al., 2012).

Além das estratégias supramencionadas, *C. glabrata* possui a capacidade de interferir com a maturação do fagossoma e evitar a sua acidificação, possuindo igualmente a capacidade de armazenamento de ferro, resistência ao *stress* oxidativo, adaptação nutricional e evasão desta mesma estrutura, conseguindo também, por outro lado, resistir ao ambiente pobre em nutrientes do fagolisossoma (Brown, 2011; Kasper, Seider, & Hube, 2015). *C. glabrata* consegue-se replicar e sobreviver entre 2-3 dias no

interior dos macrófagos, sendo esta uma estratégia para a sua disseminação hematogénica (Kasper et al., 2015).

No caso de *C. albicans*, a estratégia de sobrevivência passa pela sua capacidade de dimorfismo, levando à formação de hifa, estrutura capaz de degradar a membrana dos macrófagos (McKenzie et al., 2010). Por outro lado, como referido anteriormente, *C. glabrata* tem a capacidade de sobrevivência e multiplicação no fagolisossoma uma vez que interfere com o processo de maturação do mesmo, pelo que a sua estratégia assenta num processo de autofagia (Rodrigues et al., 2014; Roetzer, Gratz, Kovarik, & Schüller, 2010).

À imunidade inata, onde intervêm geralmente os neutrófilos e macrófagos, segue-se a imunidade adaptativa, mediada pelas células dendríticas. Estas conferem memória a longo prazo e vão ser responsáveis pela activação das células T, que se diferenciam em células T-helper (Th1, Th2 e Th17) e T-reguladoras, que vão modular a resposta imune adaptativa e combater a infecção fúngica (Brown, 2011; Wüthrich, Deepe, & Klein, 2012).

2.7. Interesse clínico

Como referido anteriormente, as espécies de *Candida* possuem a capacidade de colonizar diversas regiões anatómicas, causando infecções superficiais da pele e mucosas – candidoses cutâneas e mucocutâneas (Tabela 7) – ou infecções disseminadas e potencialmente fatais – candidemia e candidoses invasivas (Tabela 8) (Sardi et al., 2013). O tipo e dimensão da infecção são determinados pelo estado imunológico do hospedeiro (Peixoto et al., 2014).

Tabela 7. Caracterização das candidoses cutâneas e mucocutâneas. (Adaptado de Ferreira & de Sousa, 2000; Kauffman, 2008, 2016a; Oliveira, Luchese, Novak, Abreu, & Martins, 2012; Patil et al., 2015; Peixoto et al., 2014).

Candidose	Sinais/sintomas
Candidose Orofaríngea Mucosa bucal, palato, língua, cantos da boca (queilite angular), amígdalas ou faringe	<u>Candidose pseudomembranosa aguda (“sapinhos”)</u> : Placas ou nódulos brancos, confluentes, aderentes e aspecto cremoso. Facilmente removíveis. <u>Candidose atrófica crônica (“estomatite por dentadura”)</u> : Eritema doloroso, com ausência de placas.
Esofagite Esófago	Geralmente assintomática, associada a náuseas e vômitos; placas brancas eritematosas, disfagia e odinofagia, hematemese, dor epigástrica
Balanite Glande do pênis, podendo estender-se às virilhas e zona perianal	Eritema pruriginoso pustular e placas pseudomembranas
Vulvovaginite Mucosa vaginal	Eritema vulvar, prurido intenso, corrimento vaginal (geralmente branco cremoso, tipo coalho e inodoro), disúria e dispareunia
Mastite Sulco inframamário	Lesão eritematosa e pruriginosa
Candidoses anais Ânus	Lesões pruriginosas bem delimitadas, sensação de queimadura e maceração da pele
Candidoses das unhas Unha ou pele na sua periferia	<u>Paroníquia</u> (pele na periferia da unha): Lesão inflamatória, eritematosa e dolorosa <u>Oníquia</u> (unha): unhas espessas, opacas e friáveis
Candidose mucocutânea crônica (CMC) Mucosa oral, pele, unhas, couro cabeludo, tronco, mãos e dedos	Lesões vermelhas com hiperqueratinização, geralmente indolores
Intertrigo Zonas quentes e húmidas da pele (espaços interdigitais das mãos e pés, pregas sub-mamárias ou supra-púbica, virilhas e axilas)	Lesão eritematosa, descamativa, exsudativa e pruriginosa, geralmente com bordos bem definidos, rodeados por pequenas vesículas ou pústulas

Apesar de ocorrerem com menos frequência, as CI desenvolvem-se num hospedeiro vulnerável, sendo pertinente referir que a sintomatologia clínica de uma infecção

fúngica sistêmica (Tabela 8) apresenta pouca especificidade, sendo semelhantes aos sinais de septicemia bacteriana (Giolo & Svidzinski, 2010; Silva et al., 2012).

Tabela 8. Caracterização das candidoses invasivas. (Adaptado de Kauffman, 2008, 2016a; Silva et al., 2012).

Características das CI		
Infecções disseminadas	Candidemia <u>Sangue</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Manifestação mais comum de candidoses disseminada - Poderá originar choque séptico ou candidose disseminada apesar da ausência de positividade nas hemoculturas - Histologicamente: microabscessos em diversos órgãos - Aparecimento de lesões cutâneas e retinianas
	Endocardite	<ul style="list-style-type: none"> - Complicação da candidemia - Incomum e normalmente fatal
	Candidose disseminada crônica (candidose hepatoesplênica)	<p>Após contagem normalizada de neutrófilos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Febre alta - Dor e sensibilidade no hipocôndrio direito - Lesões no fígado e baço
Infecções focais invasivas	Infecções do trato urinário (Candidúria)	<ul style="list-style-type: none"> - Possibilidade de febre - Dor na região lombar - Náuseas e vômitos
	Infecções osteoarticulares	Febre e dores nas costas poderão ocorrer semanas após episódio de fungemia
	Endoftalmite Normalmente por <i>C. parapsilosis</i>	Lesões brancas na retina que podem atingir humor vítreo e conduzir a cegueira
	Peritonite	<ul style="list-style-type: none"> - Dor abdominal - Febre
	Meningite	<ul style="list-style-type: none"> - Febre - Rigidez no pescoço - Dores de cabeça - Alteração do estado mental

Apesar da elevada patogenicidade e diversidade de infecções provocadas por *C. albicans*, as CNA têm surgido cada vez mais como agentes patogénicos, desencadeando infecções semelhantes (Tabela 9) (Deorukhkar & Saini, 2015a).

Tabela 9. Manifestações clínicas relevantes associadas a espécies de *Candida* não-*albicans*. (Retirado e adaptado de Deorukhkar & Saini, 2015a; Kołaczowska & Kołaczowski, 2016; Peixoto et al., 2014; Wilson, Delport, & Ponich, 2014).

Espécie	Manifestações clínicas
<i>C. tropicalis</i>	Candidemia, candidose disseminada, candidúria associada a cateter, candidose orofaríngea, vulvovaginite
<i>C. glabrata</i>	Candidemia, candidúria, vulvovaginite, esofagite, candidose orofaríngea
<i>C. krusei</i>	Candidemia, endoftalmite, endocardite, osteomielite
<i>C. parapsilosis</i>	Candidemia, endoftalmite, endocardite, artrite séptica, peritonite e outras infecções disseminadas associadas a dispositivos protésicos, candidose orofaríngea
<i>C. lusitaniae</i>	Candidemia e outras formas de candidose sistémica
<i>C. guilliermondii</i>	Candidemia em doentes previamente sujeitos a cirurgias cardiovascular ou gastrointestinal, endocardite em indivíduos toxicodependentes
<i>C. dubliniensis</i>	Candidose orofaríngea em pacientes VIH/SIDA. Raramente desencadeia CI

3. Identificação laboratorial

O diagnóstico das candidoses cutâneas/mucocutâneas baseia-se na realização de exame directo de esfregaços de pele, unhas, mucosa oral e vaginal, com o auxílio de KOH (Hidróxido de Potássio) ou de corantes como o azul de metileno ou coloração de Gram que permitem a observação ao microscópio das diferentes estruturas: leveduras, hifas e pseudo-hifas (Hidalgo, 2016; Sobel, 2015). Na Tabela 10 estão explícitos os ideais de um teste para diagnosticar infecções invasivas por *Candida*.

Tabela 10. Características do teste ideal para diagnóstico de CI. (Retirado e adaptado de Clancy & Nguyen, 2013).

<i>Performance</i> do teste
Minimamente invasivo (exemplo: amostra de sangue ao invés de amostra de tecido)
Volumes reduzidos de amostra, rápido, sensível e específico
Exige um trabalho mínimo (enquadra-se no normal funcionamento dos laboratórios)
Fornecer dados específicos da espécie em causa e susceptibilidade aos AF
Objectivos do teste
Identificar pacientes num estadio inicial da infecção
Identificar pacientes com candidemia e candidose invasiva
Identificar pacientes com candidemia e com predisposição para desenvolvimento de CI
Identificar pacientes com candidose profunda e com resultados negativos na hemocultura
Fornecer informações de prognóstico

Todavia, não existe este teste ideal descrito na Tabela 10, tendo-se verificado que o diagnóstico de candidose invasiva é bastante complexo e apresenta algumas limitações, entre elas a baixa sensibilidade e morosidade dos métodos convencionais (Gómez et al., 2010; Quindós, Eraso, López-Soria, & Ezpeleta, 2012).

3.1. Métodos convencionais

A observação e estudo macro e microscópico das amostras clínicas, a sua inoculação em meios que permitem o isolamento do agente causal e a avaliação da resposta imunitária do hospedeiro destacam-se como métodos convencionais de diagnóstico de uma infecção por *Candida* (Gómez et al., 2010; Oren & Paul, 2014; Quindós et al., 2012).

O diagnóstico da infecção fúngica assenta na observação morfológica das colónias (estudo macroscópico) e na observação microscópica do fungo e respectivas propriedades bioquímicas, fisiológicas e imunológicas (Quindós et al., 2012). Para a detecção de CI, os métodos clássicos, entre eles microscopia directa, histopatologia e cultura, apresentam baixa sensibilidade (Sampaio & Pais, 2014).

Uma vez que as hemoculturas não permitem diagnosticar CI na ausência de candidemia, o método de eleição para este diagnóstico baseia-se na cultura de amostras de tecidos infectados, recolhidos assepticamente (Clancy & Nguyen, 2013). Através do estudo microscópico dos tecidos, torna-se igualmente possível observar estruturas específicas de *Candida* (facilitado pela utilização de corantes como o PAS – *Periodic Schiff Acid*) ou a resposta inflamatória desencadeada no hospedeiro (Quindós et al., 2012).

Porém, o estudo histológico apresenta limitações, como o facto da observação das estruturas fúngicas características apenas ser possível numa fase avançada da infecção (Quindós et al., 2012). Em alguns casos, o estado do paciente não reúne condições favoráveis à recolha de amostras de tecidos profundos (Sampaio & Pais, 2014), podendo ser um método muito invasivo e não conclusivo quanto à espécie infectante (Low & Rotstein, 2011). Devido à necessidade de rápido processamento das amostras, esta técnica exige ainda um técnico altamente qualificado (Quindós et al., 2012).

Em muitos casos é difícil a identificação de uma espécie concreta, existindo aspectos técnicos que influenciam a sensibilidade do diagnóstico microscópico: corantes aplicados na preparação da amostra, número de campos observados e ampliações utilizadas (Quindós et al., 2012).

O diagnóstico etiológico exige o isolamento em meios de cultura apropriados. *Candida* spp., sendo um agente patogénico não fastidioso, têm a capacidade de crescer na maioria dos meios *standard*, como é o caso do meio *Sabouraud* dextrose agar (SDA) (Deorukhkar & Saini, 2015a). Estes são meios selectivos, adicionados de antibióticos como o cloranfenicol e/ou gentamicina, cujo propósito é inibir o crescimento bacteriano (Quindós et al., 2012). Apesar da maior parte dos fungos crescer em meios *standard*, a partir de 1990 surgiram os meios de cultura cromogénicos, de que é exemplo o Chromagar *Candida* (Giolo & Svidzinski, 2010; Quindós et al., 2012). Os meios cromogénicos constituem um avanço no diagnóstico, já que permitem a identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* com base na coloração

das colónias, bem como a detecção de culturas mistas (Ellepola & Morrison, 2005; Giolo & Svidzinski, 2010; Quindós et al., 2012).

As espécies de *Candida* poderão ser ainda identificadas através de outros métodos fenotípicos, referidos na Tabela 11, entre eles a produção de tubo germinativo, clamidósporos (esporos assexuados resistentes produzidos em resposta a condições adversas) e testes de fermentação de açúcares (Silva et al., 2012).

Tabela 11. Características fenotípicas do diagnóstico laboratorial de *Candida*. (Adaptada de Brandt & Lockhart, 2012; Nunn, Schäfer, Petrou, & Brown, 2007; Ozcan, Ilkit, Ates, Turac-Bicer, & Demirhindi, 2010; Silva et al., 2012; University of Adelaide, 2016; Whibley & Gaffen, 2015).

	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
Meio SDA	Colónias brancas, brilhantes, lisas e de aspecto cremoso	Colónias brancas, de aspecto cremoso	Colónias de cor creme, brilhantes, lisas, de aspecto cremoso	Colónias brancas, brilhantes, de aspecto cremoso, com textura lisa/rugosa	Colónias de cor creme, com borda micelial	Colónias brancas a creme, de textura lisa
Meio CHROMagar® <i>Candida</i>	Colónias azuis esverdeadas/verdes	Colónias verdes	Colónias brancas, cor-de-rosa ou roxas	Colónias brancas	Colónias azuis escuras	Colónias cor-de-rosa com rebordo branco
Fermentação dos açúcares	Glucose e Maltose. Não fermenta Sacarose	Glucose e Maltose	Glucose e Trealose	Glucose. Não fermenta Maltose.	Glucose, Sacarose, Maltose e Galactose	Glucose. Não fermenta Maltose nem Galactose
Tubo germinativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Clamidósporos	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

As hemoculturas são um método confirmatório que, apesar da reduzida sensibilidade (cerca de 50%) e do maior tempo dispendido no diagnóstico de CI (Clancy & Nguyen, 2013), continuam a ser um método de eleição no diagnóstico de candidemia (Pappas et al., 2015; Ruhnke, 2014). Muitas vezes apenas expressam um resultado positivo numa fase posterior da infecção, pelo que existem técnicas que reduzem o tempo para detecção de hemocultura positiva e/ou aumento da sensibilidade deste método, como o método de lise-centrifugação ou a automatização das hemoculturas (Ellepola & Morrison, 2005; Quindós et al., 2012). Porém, estas poderão expressar resultados negativos quando o agente causal não se encontra na corrente sanguínea ou quando existe em concentrações inferiores ao limite detectável (Clancy & Nguyen, 2013).

Em suma, apesar de moroso e apresentar baixos rendimentos, o diagnóstico microbiológico baseado em meios de cultura é menos dispendioso e oferece material que permite a execução de TSAF (Kullberg & Arendrup, 2015; Low & Rotstein, 2011). Estes são de grande relevância para a instituição de uma terapêutica segura, correcta e eficaz, já que a emergência das espécies não-*albicans* está relacionada com a resistência aos AF (Giolo & Svidzinski, 2010).

3.2. Métodos serológicos e moleculares

A detecção do antígeno (Ag) de *Candida* ou anticorpos (Ac) anti-*Candida*, detecção de 1,3- β -D-glucano e PCR são algumas das metodologias não baseadas em meios de cultura (Clancy & Nguyen, 2013; Pappas et al., 2015).

As técnicas serológicas assumem particular relevância apenas para os casos de CI. Estas baseiam-se tanto na detecção de componentes fúngicos, como na detecção dos Ac produzidos em resposta à infecção (Gómez et al., 2010). Contudo apresentam algumas limitações, nomeadamente o facto de não distinguirem entre colonização e infecção por *Candida* (Sampaio & Pais, 2014).

Existem dois testes disponíveis no mercado que, através de ensaios imunoenzimáticos (EIA-ELISA), permitem a detecção de Ag específico de *Candida* e dos Ac específicos produzidos contra estes Ag – Platelia *Candida* Ac e Platelia *Candida* Ag (Bio-rad Laboratories). O teste Platelia *Candida* Ag permite detectar o Ag manano através da utilização de um Ac monoclonal (EB-CA1), que reconhece epítomos de manoproteínas

de diversas espécies, nomeadamente *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. dubliniensis* e *C. lusitaniae* (Rimek, Singh, & Kappe, 2003). A utilização dos dois testes permite um aumento da sensibilidade e é eficaz em doentes neutropenicos (Gómez et al., 2010; Lacasa, Rodríguez, Ortega, Mazuelos, & García, 2012).

O diagnóstico de CI poderá basear-se também na detecção de componentes não antigénicos, nomeadamente 1,3- β -D-glucano e DNA (Gómez et al., 2010). A *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a utilização, conjuntamente com isolamento em meios de cultura, do ensaio *Fungitell* (*Associates of Cape Cod, East Falmouth, Massachusetts*), que permite a detecção de 1,3- β -D-glucano (Pappas et al., 2015). Porém, a detecção deste componente apresenta algumas limitações, como a baixa especificidade e consequentes falsos-positivos (Pappas et al., 2015), pelo que um resultado positivo não é imperativo de infecção por *Candida*, já que o componente 1,3- β -D-glucano também está presente em outros fungos patogénicos (Clancy & Nguyen, 2013).

A técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é a metodologia molecular com maior impacto no diagnóstico de infecções por *Candida*, com elevada sensibilidade e especificidade, apropriada para a detecção de quantidades limitadas de ácidos nucleicos de amostras sanguíneas, tecidos ou microrganismos isolados em meios de cultura (Sampaio & Pais, 2014; Silva et al., 2012).

Existem diversas metodologias baseadas na técnica de PCR, quantitativas e/ou qualitativas, que detectam o DNA de *Candida*, entre elas o PCR em tempo real ou RT-PCR (método de PCR com transcriptase reversa). Estas técnicas permitem a identificação do género e diferenciação de espécies fúngicas, possibilitando igualmente a identificação de “espécies críticas”, isto é, potencialmente patogénicas e que não se conseguem diferenciar pelos métodos convencionais (Brandt & Lockhart, 2012; Sampaio & Pais, 2014). O PCR em tempo real é um método quantitativo que minimiza o risco de contaminação cruzada e falsos-positivos, sendo por isso o mais recomendado das técnicas de PCR (Lacasa et al., 2012).

Apesar de uma hemocultura positiva ser um método de eleição no diagnóstico de candidemia, quando surge um resultado negativo em hemocultura e positivo por PCR

em tempo real, num paciente que apresente factores de risco, é suficiente para início de terapêutica empírica antifúngica (Moreira-Oliveira et al., 2005).

O método *LightCycler SeptiFast system (Roche)* é um sistema de PCR em tempo real que permite a identificação, a partir de amostras sanguíneas, de casos de septicemia por *C. albicans* e de quatro espécies de CNA, entre elas *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* (Sampaio & Pais, 2014; Sitnik et al., 2014).

Existem outros métodos que permitem uma rápida identificação das espécies de *Candida*, como o *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) e o *Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization* (PNA-FISH) (Oren & Paul, 2014). De acordo com um estudo que comparou os dois métodos anteriormente referidos, demonstrou-se que os resultados obtidos estavam em concordância a 100% (Luzzati et al., 2013).

Ao invés de substituírem os métodos baseados em meios de cultura, as metodologias moleculares deverão ser utilizadas como complemento do diagnóstico (Clancy & Nguyen, 2013; Pappas et al., 2015; Quindós et al., 2012). O incremento na sua utilização prende-se com o facto de permitirem um diagnóstico mais rápido em pacientes com risco de desenvolverem CI (Sampaio & Pais, 2014).

As metodologias não baseadas em meios de cultura não apresentam uma relação risco/benefício favorável, comparativamente aos métodos clássicos (Giolo & Svidzinski, 2010). Por conseguinte, a maioria dos diagnósticos baseiam-se em métodos não moleculares, dado o custo elevado que acarreta a técnica de PCR, problemas na preparação da amostra e falta de protocolos *standard* para elaboração da técnica (Silva et al., 2012).

4. Tratamento

As dificuldades no diagnóstico levam muitas vezes a atrasos na implementação da terapêutica. A agravar a situação anterior, surgem as resistências de *Candida* aos AF pelo seu uso inadequado, factor este responsável pela emergência deste género e nomeadamente das espécies de CNA (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014).

4.1. Fármacos antifúngicos

Para o tratamento de candidoses superficiais, poderão ser utilizados AF tópicos ou sistémicos (Peixoto et al., 2014). Já no tratamento de CI, são administrados fármacos sistémicos que estão agrupados em quatro classes distintas, conforme o seu alvo celular (Figura 7) e mecanismo de acção para inibir ou cessar o crescimento fúngico (Sardi et al., 2013).

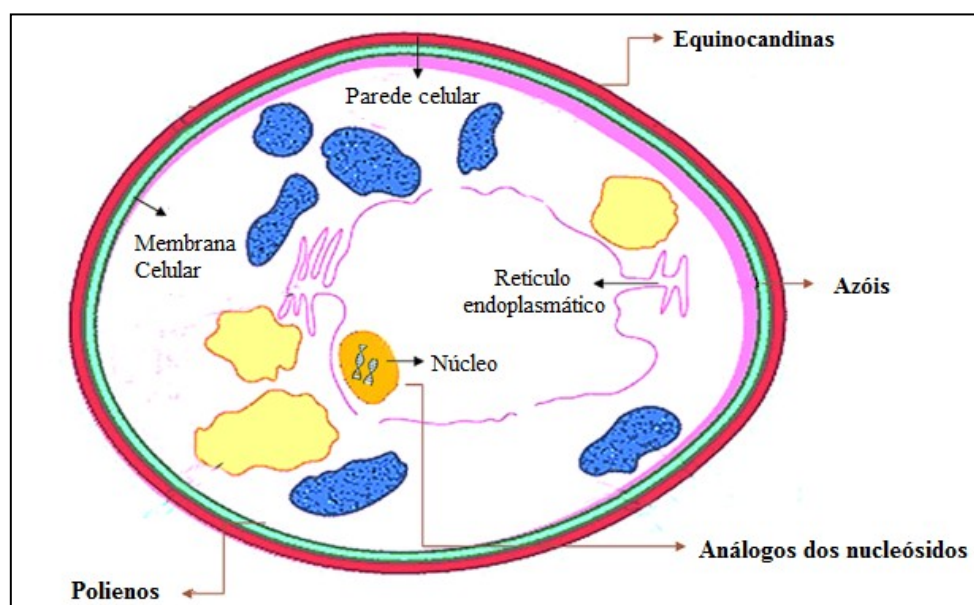


Figura 7. Classes de AF e respectivos alvos celulares. (Retirado e adaptado de Patil et al., 2015).

4.1.1. Azóis

Os azóis constituem a maior família de fármacos AF (Spampinato & Leonardi, 2013), sendo os triazóis – fluconazol (FCZ), voriconazol (VCZ), itraconazol (ICZ) e posaconazol (PCZ) – aqueles que se encontram disponíveis para tratamento de CI (Tabela 12) (Pappas et al., 2015). Estes apresentam boa tolerabilidade e um espectro de actividade antifúngica mais estreito. Normalmente, actuam como fungistáticos, estando mais propensos a resistências (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014; Mendes, 2012).

O FCZ apresenta um bom perfil de segurança, custos reduzidos (Paramythiotou et al., 2014), um perfil farmacocinético favorável e uma boa biodisponibilidade oral, boa penetração no sistema nervoso central e no compartimento intra-ocular, que justificam a sua utilização em infecções por *Candida* spp. em situações que afectam estas estruturas (Pappas et al., 2015).

O VCZ, azol de segunda geração, apresenta maior potência e um espectro de acção mais alargado que o FCZ. O efeito terapêutico do ICZ para infecções fúngicas invasivas em pacientes clinicamente instáveis encontra-se pouco estudado e o PCZ apresenta um largo espectro de actividade, sendo activo contra *Candida* spp. (Mendes, 2012; Pappas et al., 2015; Paramythiotou et al., 2014).

4.1.2. Polienos

Neste grupo inclui-se a Nistatina, utilizada topicamente em algumas candidoses superficiais, e a AmB, fármaco usado na prática clínica desde 1960 (Tabela 12) (Neumann, Baginski, Winczewski, & Czub, 2013; Peixoto et al., 2014).

A AmB apresenta propriedades fungicidas e um largo espectro de actividade contra agentes fúngicos, onde se incluem a maioria das espécies de *Candida* (Mendes, 2012; Paramythiotou et al., 2014). Apesar da susceptibilidade da maioria das espécies de *Candida* à AmB, a sua utilização em terapêutica é limitada, devido à estreita margem terapêutica e efeitos adversos tais como nefrotoxicidade (Deray, 2002) e outros relacionados com a infusão do fármaco (Gómez et al., 2010).

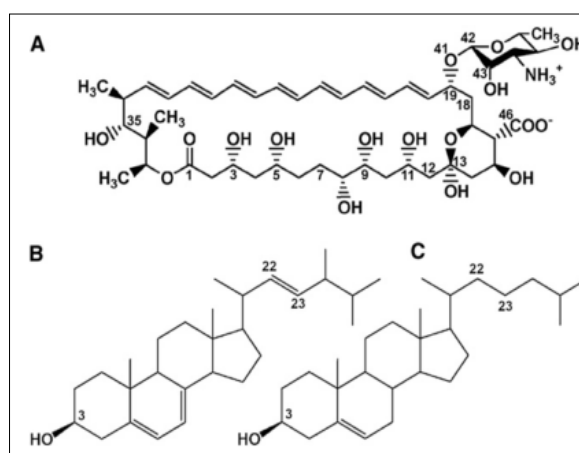


Figura 8. Estrutura química das moléculas de AmB (A), colesterol (B) e ergosterol (C). (Retirada de Neumann et al., 2013).

Através da Figura 8 pode-se verificar a semelhança entre a estrutura química do ergosterol e do colesterol do hospedeiro, o que leva a uma dificuldade na sua diferenciação que poderá reflectir-se em alguma toxicidade para o hospedeiro (Carrillo-Muñoz, Giusiano, Ezkurra, & Quindós, 2006). No entanto, a AmB tem uma maior e mais forte capacidade de ligação ao ergosterol, daí a sua toxicidade selectiva (Huang et al., 2002; Neumann et al., 2013).

De forma a diminuir a nefrotoxicidade produzida, foram desenvolvidas três formulações lipídicas deste fármaco que, embora constituam opções mais dispendiosas, estão associadas a um melhor perfil de segurança (Mistro et al., 2012). Estão comercializadas a anfotericina B lipossómica (L-AmBisome[®]), complexo lipídico de anfotericina B (ABLC, Abelcet[®]) e dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD, Amphocil[®]) (Mendes, 2012).

4.1.3. Equinocandinas

As equinocandinas integram a classe mais recente de fármacos AF, onde se incluem a caspofungina (CASP), micafungina (MICA) e anidulafungina (ANID) (Tabela 12) (Paramythiotou et al., 2014). O seu espectro de actividade inclui *Candida* spp., representando a sua actividade fungicida uma vantagem quando comparadas com o FCZ, dado as menores complicações associadas e mais rápida resolução dos sintomas (Kett et al., 2011; Paramythiotou et al., 2014).

Apesar do elevado custo, o espectro de actividade contra as diferentes espécies aliado ao excelente perfil de segurança faz desta classe uma primeira opção no tratamento de CI (Mendes, 2012; Paramythiotou et al., 2014). Importa referir que estes fármacos não atingem níveis terapêuticos no sistema nervoso central, compartimento intra-ocular e não são excretados na forma activa pela urina, pelo que não são recomendados em casos de candidose nos compartimentos referidos, bem como em casos de candidúria (Ashley et al., 2006; Paramythiotou et al., 2014).

Tabela 12. Fármacos antifúngicos e respectivos mecanismos de acção. (Retirado e adaptado de Deorukhkar & Saini, 2015a; Grover, 2010; Spampinato & Leonardi, 2013; Vermes, Guchelaar, & Dankert, 2000).

	AF	Alvo	Mecanismo de acção	Via
Azóis	FCZ VCZ ICZ PCZ	Ergosterol	Inibição da actividade da enzima lanosterol 14- α -desmetilase responsável pela biossíntese de ergosterol no retículo endoplasmático da célula fúngica, levando à acumulação de um esteroide tóxico (14- α -metil-3,6-diol) e à perda da integridade da membrana	Oral IV
Polienos	AmB	Ergosterol	Ligação ao ergosterol e interferência com os poros transmembranares (formação de poros aquosos), perturbando o fluxo de iões e aumentando a permeabilidade da membrana. Morte celular fúngica por perda dos seus componentes	IV
Equinocandinas	CASP MICA ANID	1,3- β -D-glucano	Inibição não-competitiva da enzima 1,3- β -D-glucano sintetase, o que inibe a síntese de 1,3- β -D-glucano e afecta a integridade da parede celular fúngica, que se traduz numa maior vulnerabilidade à ocorrência de lise osmótica	IV
Análogos dos nucleótidos	5-FC	Ácidos nucleicos (DNA e RNA)	A 5-FC é transportada para o interior da célula fúngica pela citosina permease, sendo desaminada a 5-fluorouracilo e, posteriormente, fosforilada a 5-fluorodeoxiuridina monofosfato, que inibe a síntese de DNA. Poderá ocorrer a fosforilação deste composto, que se incorpora no RNA e inibe a síntese proteica	Oral

4.2. Resistência aos AF

O aumento do número de infecções fúngicas, bem como da utilização de fármacos AF e crescente resistência aos mesmos, levaram à necessidade de execução de testes de susceptibilidade aos AF (TSAF), reproduzíveis e *standard*, baseados em *guidelines* de laboratórios de referência, cujo intuito se prende com a observação da capacidade de crescimento de um fungo na presença de um AF em particular, de forma a estimar o seu comportamento *in vivo*. Neste contexto, é avaliada a concentração mínima inibitória

(CMI), ou seja, a concentração mínima de AF capaz de inibir o crescimento fúngico (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014; Pfaller, 2016).

Estes testes são essenciais para a aplicação de uma terapêutica segura e eficaz, já que permitem estudar os padrões de resistência aos AF (Tabela 13) (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014; Giolo & Svidzinski, 2010). Nos casos de candidemia, a execução de TSAF é recomendada, nomeadamente aos azóis, em todos os isolados, e às equinocandinas nos casos de terapêutica prévia com esta classe ou infecção por *C. glabrata* ou *C. parapsilosis* (Pappas et al., 2015).

Tabela 13. Padrões de susceptibilidade das espécies de *Candida* aos fármacos AF. S, susceptível; SDD, susceptível dose-dependente; R, resistente. (Retirado e adaptado de Sobel, 2015).

	FCZ	ITZ	VCZ	PCZ	Amb	Equinocandinas
<i>C. glabrata</i>	SDD-R	SDD-R	S-I	S-I	S-I	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S-R
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S
<i>C. krusei</i>	R	SDD-R	S-I	S-I	S-I	S
<i>C. guilliermondii</i>	S	S	S	S	S-R	S
<i>C. lusitaniae</i>	S	S	S-I	S-I	S-R	S
<i>C. dubliniensis</i>	S	S	S	S	S	S

A resistência aos AF poderá ser classificada em microbiológica e/ou clínica, como descrito na Tabela 14.

Tabela 14. Classificação dos tipos de resistência. (Adaptada de Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014; Arendrup, 2014; Deorukhkar & Saini, 2015a; Sardi et al., 2013; Silva et al., 2012).

Resistência			
Microbiológica	TSAF <i>in vitro</i> evidenciam que a espécie de <i>Candida</i> não é susceptível ao AF	Primária ou intrínseca	Fungo apresenta resistência antes da exposição ao AF
		Secundária ou adquirida	Fungo anteriormente susceptível torna-se resistente após exposição ao AF, provavelmente devido a uma alteração na expressão de genes
Clínica	Falha no tratamento		Quando existe crescimento ou quando não existe inibição do crescimento fúngico mesmo com terapêutica adequada, persistindo a infecção.

4.2.1. Mecanismos de resistência

Os mecanismos de resistência aos AF variam consoante o modo de acção de cada uma das classes (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014).

4.2.1.1. Resistência aos azóis

Um dos mecanismos de resistência aos azóis assenta na capacidade de activação de bombas de efluxo que promovem a exocitose do fármaco, o que diminui a sua concentração na enzima-alvo (lanosterol 14- α -desmetilase) (Figura 9) (Sanguinetti, Posteraro, & Lass-Flörl, 2015). Enquanto a expressão dos genes *MDR* codifica para bombas de efluxo MFS dependentes do potencial de membrana, facto que está na origem dos elevados valores de CMI registados para o FCZ, a sobre-expressão dos genes *CDR* codifica para bombas de efluxo ABC e está relacionada com o aparecimento de resistência cruzada entre os triazóis (Cuenca-Estrella, 2010; Gonçalves, Souza, Chowdhary, Meis, & Colombo, 2016; Sanguinetti et al., 2015).

A alteração da enzima lanosterol 14- α -desmetilase ou sobre-expressão do gene que a codifica – *ERG11* – constitui um outro mecanismo que confere resistência aos azóis (Figura 9). A alteração qualitativa da enzima ocorre por mutações pontuais no gene *ERG11*, o que evita a sua ligação aos derivados triazólicos, por redução da sensibilidade (Sanguinetti et al., 2015; Silva et al., 2012).

Um outro mecanismo de resistência reside na capacidade de *Candida* produzir vias alternativas para compensar a perda de ergosterol induzida pelos azóis (Sanguinetti et al., 2015). Constatou-se que mutações no gene *ERG3* levam a uma acumulação de 14- α -metilfecosterol, ao invés de 14- α -metil-3,6-diol (produto tóxico) (Figura 9). Esta mutação bloqueia a acumulação do esterol tóxico, que de outra forma se produz quando a enzima é exposta aos triazóis (Kelly et al., 1997; Sanguinetti et al., 2015).

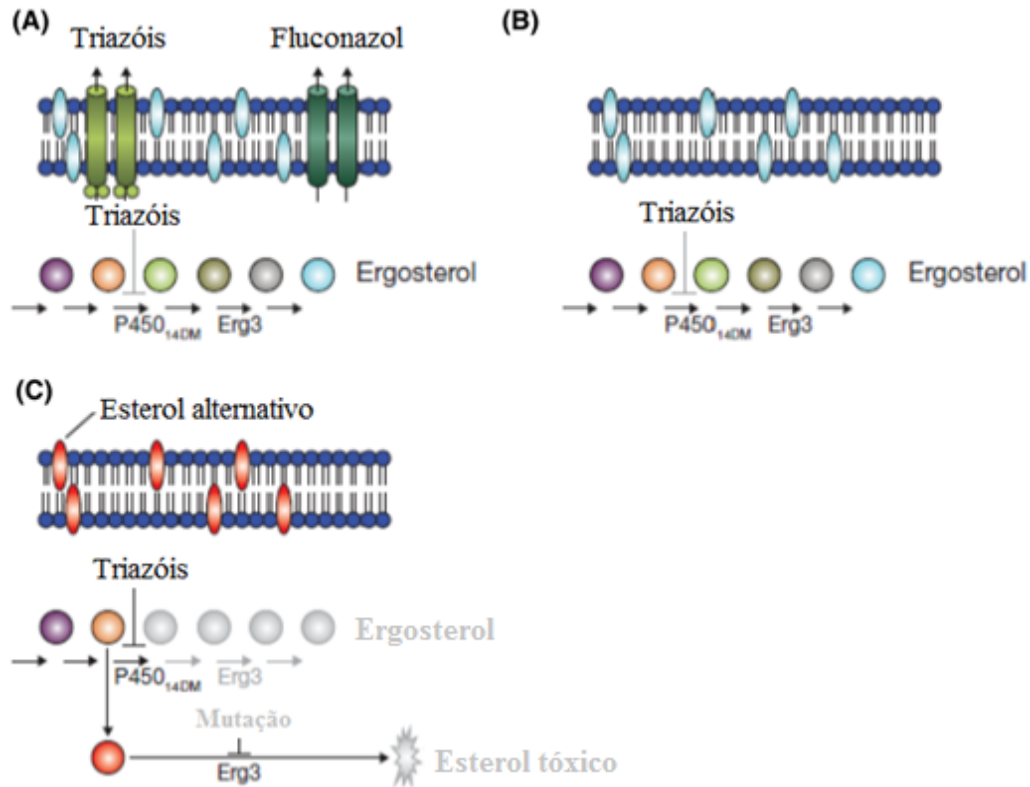


Figura 9. Mecanismos de resistência aos azóis em *C. albicans*. (A) Indução da família de bombas de efluxo ABC, que conferem resistência a diversos azóis, e bombas de efluxo MFS que conferem resistência ao FCZ, ao reduzirem a concentração de fármaco na enzima-alvo (P450_{14DM}). (B) Alteração ou sobre-expressão do gene que codifica a enzima-alvo, prevenindo ligação dos azóis. (C) Mutação no gene *ERG3*. (Retirado e adaptado de Cowen & Steinbach, 2008; Sanguinetti et al., 2015).

Os diferentes mecanismos de resistência aos azóis poderão coexistir simultaneamente, desenvolvendo-se nestes casos elevados níveis de resistência (Kończowska & Kończowski, 2016).

- Resistência das CNA aos azóis

Em *C. glabrata*, a resistência aos azóis parece não estar directamente relacionada com mutações no gene *ERG11* (del Valle, 2015). Ao contrário das outras espécies do género, a resistência em *C. glabrata* deve-se essencialmente ao aumento do efluxo de fármaco por sobre-expressão dos transportadores ABC (Tabela 15) (del Valle, 2015; Kończowska & Kończowski, 2016). Nesta espécie estão relatados dez genes *CDR*

responsáveis pela codificação dos transportadores ABC – *CDR1* - *CDR10* (Cuenca-Estrella, 2010).

A exposição aos azóis conduz a uma sobre-expressão destes genes, nomeadamente do *CgCDR1*, *CgCDR2* e *CgSNQ2*, sendo que os primeiros assumem maior importância. Esta sobre-expressão é mediada por um activador transcripcional – *CgPDR1* (Ferrari, Sanguinetti, Torelli, Posteraro, & Sanglard, 2011). Sendo assim, mutações neste factor de transcrição – mutações GOF (*gain-of-function*) – estão relacionadas com a elevada expressão dos transportadores ABC (Vale-Silva & Sanglard, 2015).

Para além das mutações GOF, a sobre-expressão dos genes que codificam transportadores ABC poderá associar-se a uma disfunção no DNA mitocondrial (mutantes *petite*), sendo este factor apontado também como um mecanismo de resistência aos azóis (Vale-Silva & Sanglard, 2015).

Um outro transportador da família ABC – *CgAUS1* – está relacionado com o transporte do esterol e poderá ser responsável pela baixa susceptibilidade intrínseca de *C. glabrata* aos azóis. Demonstrou-se que este transportador tem a capacidade de transportar colesterol do soro do hospedeiro para a membrana celular fúngica, antagonizando o efeito tóxico provocado pelos azóis (Nakayama et al., 2007).

De modo a identificar os mecanismos de resistência de *C. parapsilosis* aos azóis, o estudo levado a cabo por Silva et al. (2011) foi o primeiro em que se recorreu à análise de *microarrays* de DNA complementar (cDNA) para o estudo do genoma e identificação daqueles genes que são expressos de forma diferente. Foi possível concluir que tanto a exocitose de AF através de bombas de efluxo como a sobre-expressão dos genes envolvidos na síntese de ergosterol foram os factores apontados para a resistência (Tabela 15) (Silva et al., 2011).

O primeiro estudo detalhado acerca dos mecanismos de resistência em *C. tropicalis* aos azóis foi realizado por Vandeputte et al. (2005). Ao encontro de outro estudo, a resistência estava relacionada com uma elevada expressão do gene *ERG11* com mutações *missense* (Jiang et al., 2013; Vandeputte et al., 2005). Nesta espécie, a exocitose de fármaco através de bombas de efluxo não é apontado como o principal mecanismo de resistência aos azóis (Tabela 15) (Vandeputte et al., 2005). Apesar da sobre-expressão do gene *CtCDR1* já ter sido reportada *in vitro* quando induzida

resistência ao FCZ, tal não se observa em isolados clínicos (Barchiesi et al., 2000; Gonçalves et al., 2016; Jiang et al., 2013; Vandeputte et al., 2005).

Para além das mutações no gene *CtERG11*, são apontadas mutações no gene *CtERG3* (Tabela 15) que bloqueiam a acumulação de esteróis tóxicos, levando a alterações na constituição da membrana, sendo afectada consequentemente a sua permeabilidade. Neste contexto, estas mutações provocam alterações na difusão do fármaco através da membrana, mecanismo relacionado com a aquisição de resistência (Kołaczkowska & Kołaczkowski, 2016).

Em estirpes de *C. krusei* resistentes aos azóis, verifica-se uma expressão aumentada dos transportadores ABC1 (Gonçalves et al., 2016; Katiyar & Edlind, 2001) o que, juntamente com a baixa afinidade da enzima-alvo para o fármaco, são responsáveis pela resistência intrínseca desta espécie ao FCZ (Tabela 15) (Lamping et al., 2009; Sanguinetti et al., 2015). Poderão ser observados casos de resistência adquirida quando o doente é sujeito a terapêuticas prolongadas com este fármaco (Cuenca-Estrella, 2010).

Os mecanismos de resistência de *C. dubliniensis* aos azóis, igualmente explicitados na Tabela 15, prendem-se com um aumento das bombas de efluxo, nomeadamente dos transportadores CdCDR1, CdCDR2, codificadas pelos genes *CDR* e o transportador CdMDR1, codificado pelo gene *MDR*, aumentando a actividade destes e a exocitose do fármaco. Também as alterações no gene *ERG11* e a sua sobre-expressão medeiam a resistência nesta espécie (Gonçalves et al., 2016; Moran et al., 1998; Pfaller, 2012; Pinjon et al., 2005; Wirsching, Moran, Sullivan, Coleman, & Morschhäuser, 2001).

4.2.1.2. Resistência às equinocandinas

Os mecanismos de resistência às equinocandinas baseiam-se na ocorrência de mutações pontuais adquiridas nos genes *FKS* que codificam a enzima 1,3- β -D-glucano sintetase, em regiões denominadas “hot-spot” (HS) (Figura 10), o que leva a uma diminuição da sua sensibilidade, associado a valores elevados de CMI e consequente falha terapêutica (Beyda, Lewis, & Garey, 2012; Cuenca-Estrella, 2010). Poderão existir também casos de mutações intrínsecas, em que a forma alterada da enzima não tem tanta afinidade para o fármaco (Silva et al., 2012). Actualmente, são raros os casos de resistência a esta

classe, porém em *C. glabrata* são referenciados cada vez mais casos de resistência secundária às equinocandinas (Kauffman, 2016b).

A indução de uma resposta adaptativa ao *stress* constitui um outro mecanismo de resistência, isto é, em função da inibição da síntese de glucano, a parede celular tem a capacidade de produzir outros componentes (por exemplo, quitina) (Figura 10) (Sanguinetti et al., 2015). Esta resposta leva a um aumento da concentração de quitina na parede celular e efeito de crescimento paradoxal *in vitro*, ou seja, a capacidade de crescimento acima da CMI (Walker, Gow, & Munro, 2010).

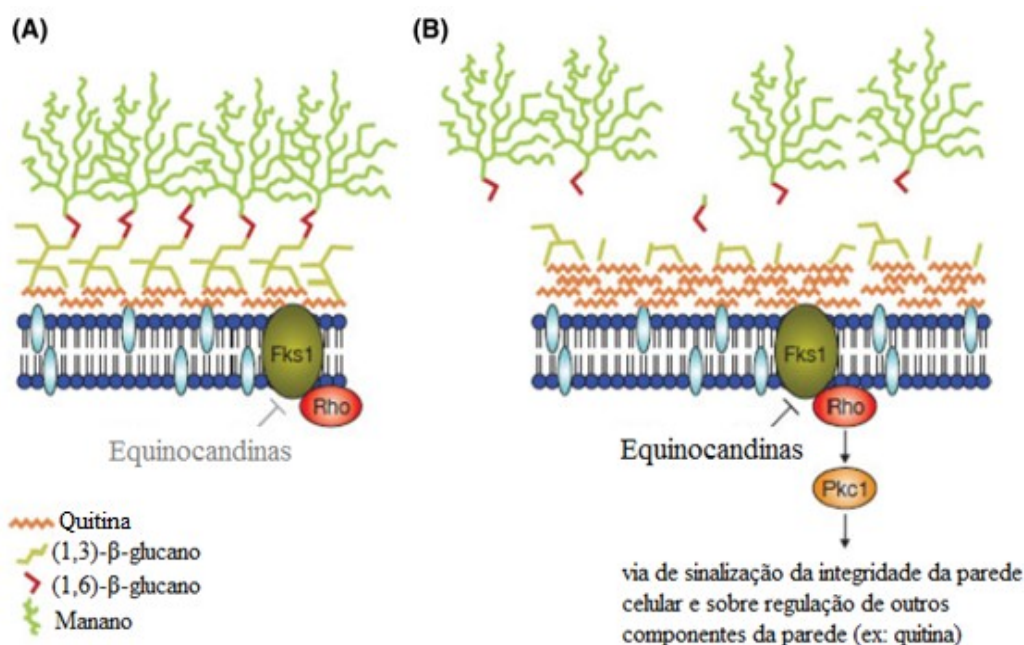


Figura 10. Mecanismos de resistência às equinocandinas em *C. albicans*. (A) Mutações pontuais e mutações intrínsecas em regiões específicas dos genes *FKS*. (B) Rho1 é um regulador positivo da enzima que contribui para a resistência às equinocandinas ao mediar uma resposta adaptativa ao *stress*, como a activação de uma via de sinalização da integridade da parede celular mediada pela proteína quinase C (PKC) e sobre-regulação da síntese de outros componentes da parede celular, como a quitina. (Retirado e adaptado de Cowen & Steinbach, 2008; Sanguinetti et al., 2015).

- Resistência das CNA às equinocandinas

Nas estirpes de *C. glabrata* resistentes às equinocandinas verifica-se a existência de uma mutação adquirida nos genes *FKS1* e/ou *FKS2* (Tabela 15) (Pfaller et al., 2012), afectando a síntese de 1,3- β -D-glucano, o que explica os elevados valores de CMI observados (Rodrigues et al., 2014). As equinocandinas apresentam excelente actividade frente a esta espécie, porém a exposição prévia é responsável pela ocorrência de mutações nos genes *FKS* que constituem um mecanismo de resistência (Alexander et al., 2013; Beyda et al., 2014; Shields et al., 2015).

C. parapsilosis, em comparação com as restantes espécies do género, é aquela onde se verificam os valores mais elevados de CMI para as equinocandinas (Silva et al., 2012). A reduzida susceptibilidade desta espécie e de *C. guilliermondii* (que também apresenta valores de CMI elevados) deve-se à ocorrência natural de polimorfismos na região “hotspot” 1 da subunidade catalítica *FKS1* da enzima-alvo (Tabela 15) (Beyda et al., 2012; Cowen & Steinbach, 2008; Gonçalves et al., 2016).

O perfil de resistência ou reduzida susceptibilidade de *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. krusei* às equinocandinas, identificado na Tabela 15, está associado à ocorrência de mutações pontuais em regiões “hotspot” (HS) do gene *FKS1* (Forastiero et al., 2015; Park et al., 2005; Pfaller, 2012; Sanguinetti et al., 2015). Também a resistência de *C. lusitaniae* está relacionada com mutações *missense* associadas à região HS1 do gene *FKS1* da enzima 1,3- β -D-glucano sintetase (Tabela 15) (Asner, Giulieri, Diezi, Marchetti, & Sanglard, 2015).

Além das mutações nos genes *FKS1* ou *FKS2*, a produção de quitina em resposta à exposição ao fármaco, como referido anteriormente, é apontada como um mecanismo de resistência em diversas espécies de CNA, entre elas *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. guilliermondii* (Kończowska & Kończowski, 2016).

4.2.1.3. Resistência aos polienos

Nesta classe destaca-se a AmB que, apesar de não ser frequente a existência de resistências a este fármaco entre as espécies de CNA (Kończowska & Kończowski, 2016), já foram reportados casos de resistência cruzada entre a AmB e os azóis ou

caspofungina (Eddouzi et al., 2013; Forastiero et al., 2013; Krogh-Madsen, Arendrup, Heslet, & Knudsen, 2006; Morio, Pagniez, Lacroix, Miegerville, & Le Pape, 2012).

A resistência adquirida está relacionada com mutações que ocorrem no gene *ERG3*, cujas enzimas que codificam participam na síntese de ergosterol. Estas mutações afectam a biossíntese deste componente, podendo ocorrer modificações nos lípidos de membrana e um decréscimo na quantidade sintetizada (Cuenca-Estrella, 2010; Morio et al., 2012). Outros estudos reportam que as mutações genéticas, para além de afectarem o gene *ERG3*, poderão afectar outros genes envolvidos na síntese do ergosterol – *ERG2*, *ERG5*, *ERG6* ou *ERG11*, levando à diminuição da sua quantidade ou à síntese de outros esteróis, alterações estas responsáveis pela redução da afinidade do fármaco para o seu alvo celular (Gonçalves et al., 2016).

Estudos recentes evidenciam que a exposição à AmB leva à produção de ROS, responsáveis pela morte celular. Um outro mecanismo de resistência à AmB prende-se com um aumento da produção de catalases, respondendo desta forma ao *stress* oxidativo induzido pelo fármaco (Pemán, Cantón, & Espinel-Ingroff, 2009).

- Resistência das CNA aos polienos

Raramente se verifica a aquisição de resistência a este AF pelas espécies de CNA, exceptuando *C. lusitaniae* que é em muitos casos resistente ou desenvolve muitas vezes resistência à Amb (Kauffman, 2016b). Ainda que infrequente, já foram reportadas resistências à AmB em *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Tabela 15) (Bari, Sharma, Alfatah, Mondal, & Ganesan, 2015; Deorukhkar & Saini, 2015a; Kołaczowska & Kołaczowski, 2016; Vale-Silva & Sanglard, 2015).

Em *C. glabrata*, os mecanismos de resistência aos polienos não se encontram totalmente elucidados, estando associados a mutações nos genes *ERG2* e *ERG6* envolvidos na biossíntese do ergosterol, levando a uma diminuição da sua quantidade (Vale-Silva & Sanglard, 2015). Porém, como referido anteriormente, *C. glabrata* tem a capacidade de capturar colesterol da célula hospedeira e deste modo compensar a perda induzida pelas mutações (Nagi et al., 2013).

Nesta espécie foi também proposto um mecanismo de resistência relacionado com uma lipoproteína plasmática de membrana (Pmp3) envolvida na manutenção do potencial de

membrana e homeostase, onde se demonstrou que esta contrariava o efeito da Amb, estando a sobre-expressão do gene *PMP3* implicada num aumento da resistência a este fármaco (Bari et al., 2015).

Os isolados de *C. tropicalis* resistentes à Amb vêm a sua actividade mitocondrial alterada, observando-se uma diminuição na quantidade de ROS. Nesta espécie foram também identificadas mutações em genes que participam na via da biossíntese do ergosterol – *ERG2*, *ERG3*, *ERG5*, *ERG6* e *ERG11* (Kończakowska & Kończakowski, 2016).

Os mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida de *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* à Amb também não estão esclarecidos (Asner et al., 2015), podendo dever-se à capacidade de *switch* fenotípico (Lastauskienė et al., 2015; Miller, Dick, & Merz, 2006) e a mutações ou alterações na expressão dos genes envolvidos na síntese de ergosterol (Young, Hull, & Heitman, 2003).

4.2.1.4. Resistência à 5-FC

A resistência primária de *Candida* à 5-FC ocorre com baixa regularidade (Spampinato & Leonardi, 2013). Porém, a resistência secundária desenvolve-se facilmente devido ao complexo modo de acção, bem como os elevados níveis de resistência em regimes de monoterapia, sendo por isso utilizado em combinação com outros agentes, como o FCZ ou AmB (Pappas et al., 2015; Paramythiotou et al., 2014; Vermes et al., 2000).

Tabela 15. Mecanismos de resistência das espécies de CNA aos AF. Cd, *C. dubliniensis*; Ct, *C. tropicalis*; Cgla, *C. glabrata*; Cp, *C. parapsilosis*; Ck, *C. krusei*; –, mecanismo não observado (mas descrito); +, mecanismo observado; ND, mecanismo não descrito. (Retirado e adaptado de Gonçalves et al., 2016; Kołaczowska & Kołaczowski, 2016; Sanguinetti et al., 2015).

	Mecanismos de resistência	Causa	Efeito	Ocorrência em <i>Candida</i> spp.				
				Cd	Ct	Cgla	Cp	Ck
Azóis	Diminuição da concentração intracelular de fármaco	Expressão de genes que codificam transportadores ABC	Efluxo de fármaco	+	–	+	+	+
		Expressão de genes que codificam transportadores MFS		+	–	–	+	ND
	Alterações no local de ligação do fármaco à enzima	Mutações no gene <i>ERG11</i>	Diminuição da afinidade da enzima-alvo para os azóis	+	+	–	+	+
	Produção aumentada da enzima-alvo	Múltiplos factores ⁴	Aumento da síntese de ergosterol	+	+	+	+	+
Polienos (Amb)	Alterações na permeabilidade da membrana	Mutações em genes implicados na biossíntese de ergosterol	Modificações nos lípidos de membrana	ND	–	–	ND	–
Equinocandinas	Mutações nos genes <i>FKS</i> que codificam as subunidades da enzima alvo	Mutações nos genes <i>FKS1</i> e/ou <i>FKS2</i>	Diminuição da afinidade das equinocandinas para a enzima-alvo	<i>FKS1</i>	<i>FKS1</i>	<i>FKS1</i> <i>FKS2</i>	<i>FKS1</i>	<i>FKS1</i>
	Crescimento paradoxal	Capacidade de produção de outros componentes	Crescimento acima da CMI	+	+	ND	+	+

⁴ Duplicação genética (sobre-expressão do gene *ERG11*), mutações no gene promotor ou nos genes que codificam a enzima-alvo.

4.2.1.5. Resistência cruzada

A resistência-cruzada poderá ocorrer entre fármacos da mesma ou de diferentes classes, em função de regimes terapêuticos em que dois ou mais fármacos são utilizados em combinação ou sequencialmente (Kołaczkowska & Kołaczkowski, 2016).

Em *C. tropicalis*, a resistência cruzada é apontada como um dos factores responsáveis pela emergência já que foram reportados casos de resistência cruzada entre os azóis (Forastiero et al., 2013; Pfaller & Diekema, 2007). Segundo um estudo de Forastiero et al. (2013), também se verificou a existência de resistência cruzada entre os derivados azólicos e a Amb.

A emergência de *C. glabrata* associa-se a resistência cruzada entre os diferentes AF, tendo sido reportados casos de resistência cruzada entre os azóis e resistência às equinocandinas, sendo uma preocupação crescente a existência de isolados resistentes a ambas as classes (Pfaller & Diekema, 2007; Pfaller et al., 2012; Sanguinetti et al., 2015).

4.2.2. Biofilmes

A resistência intrínseca associada aos biofilmes de *Candida* é atribuída a um conjunto de factores, tais como a elevada densidade das células no seu interior, efeitos da matriz extracelular na penetração dos fármacos, expressão de genes resistentes, nomeadamente aqueles que codificam bombas de efluxo e presença de células “persistentes” (Rodrigues et al., 2014).

As candidoses são normalmente derivadas da formação de biofilmes maduros, já que nestes as espécies leveduriformes beneficiam entre si ao formarem comunidades biológicas envolvidas numa matriz extracelular, que lhes permite a passagem de água e nutrientes (Giolo & Svidzinski, 2010), tornando-se assim a sua estrutura, em comparação com as células planctónicas (formas unicelulares em suspensão), mais resistente às terapêuticas AF instituídas e defesas do próprio hospedeiro (Fanning & Mitchell, 2012). Apesar da existência de água no interior do biofilme que facilita a difusão dos fármacos, esta também é dificultada pelos componentes que constituem a matriz. A difusão dos AF é mais acelerada em *C. glabrata* e *C. krusei*, quando comparada com *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Al-Fattani & Douglas, 2006).

4.3. Terapêuticas

A resistência de *Candida* aos AF é multifactorial, associando-se a factores relacionados com o agente patogénico, antifúngico e hospedeiro que deverão ser considerados aquando da escolha da terapêutica (Figura 11) (Deorukhkar & Saini, 2015a). Importa também considerar a espécie de *Candida* e a exposição prévia a terapêuticas com azóis ou equinocandinas (Pappas et al., 2015).

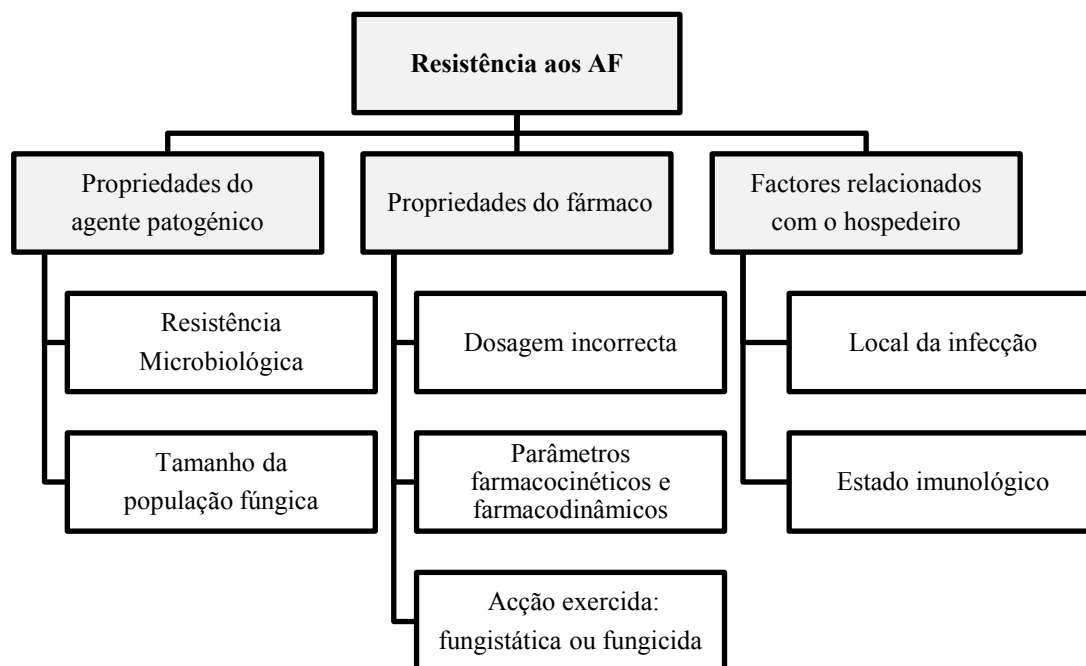


Figura 11. Factores que contribuem para a resistência aos AF. (Retirado e adaptado de Deorukhkar & Saini, 2015a).

Os agentes antifúngicos utilizados no tratamento de candidose variam consoante se tratem de infecções superficiais ou sistémicas. As candidoses superficiais são em muitos casos auto-limitadas em indivíduos saudáveis, passando muitas vezes o seu tratamento por medidas de higiene ou AF tópicos (Deorukhkar & Saini, 2015a; Spampinato & Leonardi, 2013). Nas candidoses mucocutâneas, de uma maneira geral, os cremes locais, soluções, suspensões ou pastilhas apresentam-se como terapêutica inicial (Kauffman, 2008). Na Tabela 16 é feita referência ao tratamento das candidoses superficiais mais comuns.

Tabela 16. Tratamento das candidoses superficiais segundo as recomendações da IDSA. (Adaptado de Pappas et al., 2015).

Infecção	Terapêutica recomendada IDSA
Candidose Vulvovaginal	- Casos não complicados: AF tópicos ou FCZ via oral - Infecções agudas graves: FCZ
Candidose orofaríngea	- Infecções ligeiras: Clotrimazol ou Miconazol Alternativa: Nistatina - Infecções graves: FCZ
Candidose esofágica	- FCZ oral - Impossibilidade de via oral: FCZ IV ou equinocandina e terapêutica de-escalação para FCZ oral

No tratamento de CI poderão ser adoptadas diferentes estratégias terapêuticas: profiláctica, pré-emptiva, empírica e documentada (Figura 12). A terapêutica profiláctica engloba os casos de ausência de infecção, em que os sinais/sintomas são inexistentes. Na terapêutica pré-emptiva o doente apresenta factores de risco e marcadores serológicos de infecção, pelo que se defende a instituição de terapêutica dado o elevado risco de candidose. A terapêutica empírica é iniciada com base em evidências clínicas apesar da inexistência de confirmação microbiológica, em doentes que apresentam sinais e sintomas de infecção. Já a terapêutica documentada é direccionada, uma vez que o agente patogénico encontra-se microbiologicamente confirmado e é sustentada por evidências clínicas (Cornely et al., 2012; Guery et al., 2009; Mendes, 2012).

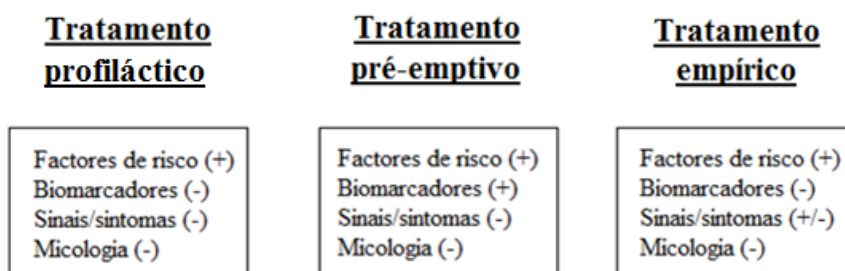


Figura 12. Tipos de tratamento para suspeita de candidose em doentes em estado crítico. (Retirado e adaptado de Paramythiotou et al., 2014).

Existem diversas razões que levam a crer que a terapêutica profiláctica com azóis poderá ser vantajosa em doentes de alto risco, nomeadamente a inespecificidade dos

sinais/sintomas de infecção, dificuldade de obtenção de um diagnóstico preciso e consequentes atrasos na instituição da terapêutica e taxas de morbilidade e mortalidade associadas (Garnacho-Montero, Díaz-Martín, De Piappón, & García-Cabrera, 2012). A terapêutica profiláctica é referida como benéfica na prevenção de CI em doentes neutropénicos com patologias hemato-oncológicas, após transplantes de medula óssea, receptores de órgãos sólidos e doentes de alto risco submetidos a cirurgia em UCI para prevenção de infecções intra-abdominais (Cornely et al., 2012; Pappas et al., 2009; Pfaller & Diekema, 2007).

No entanto, em doentes na UCI ainda são questionáveis as vantagens de uma terapêutica profiláctica e quais os pacientes de alto risco que dela beneficiariam (Pappas et al., 2015; Paramythiotou et al., 2014). A dúvida reside no facto dos dados serem inconclusivos quanto à sua eficácia, devido aos múltiplos desenhos de estudo e heterogeneidade da população estudada, existindo limitações inerentes: impossibilidade de definir um doente de alto risco em UCI, AF utilizado, dose e formulação, e doenças subjacentes (Paramythiotou et al., 2014; Párola, 2010).

Em UCI que demonstrem elevadas taxas de CI, superiores a 5% dos doentes, a terapêutica profiláctica poderá ser considerada em populações seleccionadas de doentes com elevado risco de CI (Pappas et al., 2015). Porém, de acordo com Kauffman (2016b), a utilização rotineira de AF em profilaxia não é recomendada. A utilização generalizada e inadequada do FCZ como agente profiláctico conduz ao desenvolvimento de resistências e incremento de candidoses por estirpes resistentes a este AF, o que se traduz igualmente na emergência das espécies não-*albicans* (Oren & Paul, 2014; Paramythiotou et al., 2014; Párola, 2010).

Actualmente, não existem evidências que sustentem a utilização das terapêuticas pré-emptiva e empírica na UCI, pelo que é necessária maior investigação de modo a apurar os seus benefícios (Guery et al., 2009). De acordo com a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA), nos doentes em estado crítico e com suspeita de CI, deverá ser realizada uma avaliação dos marcadores de infecção ou dados obtidos de meios de cultura de locais não estéreis, devendo ser iniciada terapêutica empírica com equinocandinas em casos onde existem factores de risco e febre de origem desconhecida, bem como sinais de choque séptico (Guery et al., 2009; Pappas et al., 2015).

Em doentes sem exposição prévia ao FCZ, este poderá ser uma opção desde que a espécie em causa seja susceptível ao fármaco (Pappas et al., 2015). Porém, segundo Golan (2009), uma terapêutica empírica com FCZ em doentes com septicemia na UCI revela-se desvantajosa dada a possibilidade de desenvolvimento de resistências e falha terapêutica em infecções por espécies não-*albicans*.

Os fármacos de primeira linha numa terapêutica documentada são escolhidos com base no perfil de susceptibilidade da espécie responsável pela infecção (Mendes, 2012). Nos doentes neutropenicos, o sucesso terapêutico é fortemente influenciado pela subida de neutrófilos, uma vez que a sua função é preponderante na defesa do hospedeiro (Pappas et al., 2015). De acordo com a IDSA e a *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID), é dado ênfase ao papel das equinocandinas como fármacos de eleição dado o desenvolvimento de resistências ao FCZ (Cornely et al., 2012; Pappas et al., 2015). Na Tabela 17 estão representadas as directrizes da IDSA para o tratamento de candidemia e candidose invasiva. Como referido anteriormente, em todos os casos é essencial ter-se em consideração o local de infecção.

Tabela 17. Recomendações da IDSA para o tratamento de candidemia e candidose invasiva em adultos. (Retirada e adaptada de Kauffman, 2016b; Pappas et al., 2015).

	Adultos não neutropenicos	Adultos neutropenicos
Terapêutica primária	Terapêutica inicial: Equinocandina	
	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Alternativa: FCZ</u>, em pacientes clinicamente estáveis e que seja improvável uma infecção por espécies de <i>Candida</i> resistentes ao FCZ - <u>Alternativa: AmB⁵</u> (caso de intolerância ou resistência aos restantes AF) 	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Alternativa: FCZ</u>, para pacientes clinicamente estáveis e sem exposição prévia a azóis - <u>Alternativa: AmB⁵</u>, cuja potencial toxicidade poderá ser uma limitação à sua utilização
Terapêutica de-escalação	- <u>FCZ</u> : em pacientes clinicamente estáveis, com infecção por espécies susceptíveis ao FCZ e hemoculturas negativas após início da terapêutica	<ul style="list-style-type: none"> - <u>FCZ</u>: pacientes clinicamente estáveis com neutropenia persistente, infecção por estirpe susceptível ao FCZ e com hemoculturas negativas - <u>VCZ</u>: poderá ser usado em infecções por estirpes susceptíveis ao VCZ e hemoculturas negativas
Comentários	Recomendada fundoscopia até uma semana após diagnóstico (controlar possibilidade de endoftalmite)	<ul style="list-style-type: none"> - Recomendada fundoscopia e repeti-la no prazo de 7 dias após recuperação do estado neutropenico - <u>Tranfusão de G-CSF</u> (Factor estimulante de colónias de granulócitos): considerada em pacientes que se prevê neutropenia prolongada

⁵ FL – Formulação lipídica

No caso de infecções por *C. glabrata*, é recomendada terapêutica com equinocandinas ao invés de AmB. No entanto, quando os isolados são resistentes às equinocandinas, por exposição prévia ou desenvolvimento de resistências após início de terapêutica profiláctica ou empírica, deverá ser administrada a AmB até conhecimento dos resultados dos TSAF (Kauffman, 2016b; Pappas et al., 2015). O VCZ poderá ser uma opção de terapêutica de-escalação, porém existe a possibilidade de resistência cruzada com o FCZ (Kauffman, 2016b).

Em candidoses por *C. krusei*, espécie com resistência intrínseca ao FCZ, a terapêutica preferencial é igualmente uma equinocandina, podendo ser também administrado VCZ como terapêutica de-escalação, ou AmB em doses mais elevadas dado o elevado valor de CMI (Kauffman, 2016b).

Em infecções por *C. parapsilosis*, as equinocandinas não são recomendadas como terapêutica, uma vez que esta espécie é a que apresenta os valores mais elevados de CMI para esta classe de antifúngicos (Pappas et al., 2009, 2015; Paramythiotou et al., 2014). Exceptuando as infecções causadas por *C. parapsilosis*, a força de recomendação para terapêutica direccionada com FCZ é baixa (Cornely et al., 2012).

A duração do tratamento deverá ser de 14 dias após primeira hemocultura negativa e resolução dos sinais e sintomas (Pappas et al., 2015). Caso seja possível e o paciente se encontre clinicamente estável e infectado por uma espécie susceptível, o *switch* de terapêutica IV para oral deverá ser considerado após 10 dias de tratamento (Cornely et al., 2012).

5. Conclusão

Com a realização da presente monografia, que reúne informação actualizada, foi possível concluir que a prevalência de infecções fúngicas por *Candida*, nomeadamente por espécies não-*albicans*, tem vindo a aumentar nos últimos anos, constituindo um problema actual de saúde pública.

A transmissão destas infecções dá-se normalmente por via endógena. Porém, dado o seu carácter ubiquitário, existe uma prevalência elevada das espécies de CNA que desencadeiam infecções nosocomiais, nomeadamente na UCI, sendo neste contexto a via exógena o principal modo de transmissão.

A emergência das infecções por CNA tem origem multifactorial, onde se podem destacar os avanços nos cuidados de saúde e nas técnicas de diagnóstico, o aumento da população imunocomprometida, que se deve em grande parte à epidemia VIH/SIDA e a outras comorbilidades do hospedeiro, onde as neoplasias apresentam um grande impacto e um contexto clínico actual.

Um outro aspecto preponderante na prevalência das espécies não-*albicans* passa pelo desenvolvimento de mecanismos que permitem a sua sobrevivência no interior da célula hospedeira, bem como a existência de resistências aos AF, intrínsecas ou adquiridas, que dependem da espécie de *Candida*, do fármaco e do hospedeiro. Também a limitação no número de fármacos existentes bem como a sua acção predominantemente fungistática são factores que poderão contribuir para o desenvolvimento de resistências.

Relativamente às propriedades relacionadas com as espécies de CNA, estas detêm importantes factores de virulência que aliados à fraca imunidade do hospedeiro contribuem para a sua patogenicidade. Entre eles destacam-se a capacidade de adesão, secreção de enzimas hidrolíticas, dimorfismo, alterações fenotípicas e formação de biofilmes.

C. glabrata é a única espécie de *Candida* que se apresenta apenas na forma leveduriforme, estando a sua emergência associada a estratégias de sobrevivência como o mecanismo de fagocitose induzida. Já os biofilmes detêm um papel importante na emergência de CNA já que estas estruturas, devido à sua matriz extracelular, apresentam uma elevada resistência à penetração dos fármacos AF.

Os microbiologistas deparam-se com a complexidade de realização de um correcto diagnóstico, sendo este fundamental para que a terapêutica seja instituída o mais precocemente possível. Neste contexto, uma terapêutica profiláctica ou empírica, nomeadamente com FCZ, poderá igualmente representar um factor responsável pelo desenvolvimento de resistência ao fármaco e crescente número de episódios infecciosos. A imunogenética poderá constituir uma área de interesse na medida em que poderá auxiliar na antevisão do risco de terapêutica precoce.

Actualmente, as diferentes estratégias terapêuticas também constituem um desafio na prática clínica, onde os TSAF *in vitro* poderão auxiliar na sua selecção. De uma maneira geral, a escolha inicial recai sobre uma equinocandina e a terapêutica de-escalação sobre um azol. No entanto, é sempre imprescindível ter em consideração o local de infecção, a espécie de CNA que está na sua origem e o seu padrão de susceptibilidade aos AF.

Apesar da terapêutica precoce estar associada a um provável melhor prognóstico, com esta emergem novos padrões de resistência. Por outro lado, a terapêutica documentada é direccionada, ou seja, institui-se de acordo com o microrganismo microbiologicamente identificado, estando por isso implícita uma diminuição da emergência de novos perfis de resistência.

Em suma, com o aumento das espécies resistentes aos fármacos convencionalmente utilizados e aumento da população imunocomprometida, bem como as elevadas taxas de mortalidade associadas a infecções por CNA, advém a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que sejam efectivas.

6. Referências bibliográficas

- Alcazar-Fuoli, L., & Mellado, E. (2014). Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *British Journal of Haematology*, 166(4), 471–484. doi:10.1111/bjh.12896
- Alexander, B. D., Johnson, M. D., Pfeiffer, C. D., Jimenez-Ortigosa, C., Catania, J., Booker, R., ... Pfaller, M. A. (2013). Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of *FKS* mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clinical Infectious Diseases*, 56(12), 1724–1732. doi:10.1093/cid/cit136
- Al-Fattani, M. A., & Douglas, L. J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 55(8), 999–1008. doi:10.1099/jmm.0.46569-0
- Arendrup, M. C. (2014). Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(Suppl. 6), 42–48. doi:10.1111/1469-0691.12513
- Ashley, E. S. D., Lewis, R., Lewis, J. S., Martin, C., & Andes, D. (2006). Pharmacology of systemic antifungal agents. *Clinical Infectious Diseases*, 43(Suppl. 1), S28–S39. doi:10.1086/504492
- Asner, S. A., Giulieri, S., Diezi, M., Marchetti, O., & Sanglard, D. (2015). Acquired multidrug antifungal resistance in *Candida lusitanae* during therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(12), 7715–7722. doi:10.1128/AAC.02204-15
- Barchiesi, F., Calabrese, D., Sanglard, D., Di Francesco, L. F., Caselli, F., Giannini, D., ... Scalise, G. (2000). Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6), 1578–1584. doi:10.1128/AAC.44.6.1578-1584.2000
- Bari, V. K., Sharma, S., Alfatah, M., Mondal, A. K., & Ganesan, K. (2015). Plasma membrane proteolipid 3 protein modulates amphotericin B resistance through sphingolipid biosynthetic pathway. *Scientific Reports*, 5, 9685. doi:10.1038/srep09685
- Beyda, N. D., John, J., Kilic, A., Alam, M. J., Lasco, T. M., & Garey, K. W. (2014). *FKS* mutant *Candida glabrata*: risk factors and outcomes in patients with candidemia. *Clinical Infectious Diseases*, 59(6), 819–825. doi:10.1093/cid/ciu407

- Beyda, N. D., Lewis, R. E., & Garey, K. W. (2012). Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. *Annals of Pharmacotherapy*, 46, 1086–1096. doi:10.1345/aph.1R020
- Bhawna, S., Sangeeta, D., & Udayan, G. (2015). Vulvovaginal candidiasis in women of reproductive age group: importance of proper diagnosis and alarm for emerging non-*albicans Candida* among candidal vulvovaginitis cases. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(11), 7561–7564. Disponível em <http://www.recentscientific.com/sites/default/files/3912.pdf>
- Brandt, M. E., & Lockhart, S. R. (2012). Recent taxonomic developments with *Candida* and other opportunistic yeasts. *Current Fungal Infection Reports*, 6(3), 170–177. doi:10.1007/s12281-012-0094-x
- Brown, G. D. (2011). Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annual Review of Immunology*, 29, 1–21. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101229
- Brown, G. D., Denning, D. W., & Levitz, S. M. (2012). Tackling human fungal infections. *Science*, 336(6082), 647. doi:10.1126/science.1222236
- Brunke, S., & Hube, B. (2013). Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cellular Microbiology*, 15(5), 701–708. doi:10.1111/cmi.12091
- Bujdáková, H. (2016). Management of *Candida* biofilms – state of knowledge and new options for prevention and eradication. *Future Microbiology*, 11(2), 235–251. doi:10.2217/fmb.15.139
- Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A. S., Sakthikumar, S., Munro, C. A., ... Cuomo, C. A. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459(7247), 657–662. doi:10.1038/nature08064
- Carrillo-Muñoz, A. J., Giusiano, G., Ezkurra, P. A., & Quindós, G. (2006). Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Revista Española de Quimioterapia*, 19(2), 130–139. Disponível em <http://www.seq.es/seq/0214-3429/19/2/130.pdf>
- Clancy, C. J., & Nguyen, M. H. (2013). Finding the “Missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clinical Infectious Diseases*, 56(9), 1284–1292. doi:10.1093/cid/cit006
- Cornely, O. A., Bassetti, M., Calandra, T., Garbino, J., Kullberg, B. J., Lortholary, O., ... Ullmann, A. J. (2012). ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clinical Microbiology*

- and Infection*, 18(Suppl. 7), 19–37. doi:10.1111/1469-0691.12039
- Costa-de-Oliveira, S., Pina-Vaz, C., Mendonça, D., & Gonçalves Rodrigues, A. (2008). A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 27(5), 365–374. doi:10.1007/s10096-007-0448-4
- Cowen, L. E., & Steinbach, W. J. (2008). Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryotic Cell*, 7(5), 747–764. doi:10.1128/EC.00041-08
- Cuenca-Estrella, M. (2010). Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Revista Española de Quimioterapia*, 23(4), 169–176. Disponível em <http://seq.es/seq/0214-3429/23/4/cuenca.pdf>
- Dalle, F., Wächtler, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., Wilson, D., ... Hube, B. (2010). Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cellular Microbiology*, 12(2), 248–271. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01394.x
- De Rossi, T., Lozovoy, M. A. B., da Silva, V., Fernandes, E. V., Geraldino, T. H., Costa, I. C., ... Felipe, I. (2011). Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 32(1), 15–28. doi:10.5433/1679-0367.2011v32n1p15
- del Valle, G. M. M. (2015). *Candida glabrata*: an emerging pathogen. *Biociencias*, 10(1), 89–102. Disponível em <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5460373>
- Deorukhkar, S. C., & Saini, S. (2016). Why *Candida* species have emerged as important nosocomial pathogens? *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(1), 533–545. doi: 10.20546/ijcmas.2016.501.054
- Deorukhkar, S. C., & Saini, S. (2015a). Non *albicans Candida* species: A review of epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *Pravara Medical Review*, 7(3), 7–15. Disponível em <http://www.pravara.com/pmr/pmr-7-3-3.pdf>
- Deorukhkar, S. C., & Saini, S. (2015b). Virulence factors attributed to pathogenicity of non *albicans Candida* species isolated from Human Immunodeficiency virus infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Annals of Pathology and Laboratory Medicine*, 2(2), A62–A66. Disponível em <http://www.pacificjournals.com/journal/index.php/apalm/article/viewFile/151/pdf>

- Deorukhkar, S. C., Saini, S., & Mathew, S. (2014a). Non-*albicans Candida* infection: an emerging threat. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, 1–7. doi:10.1155/2014/615958
- Deorukhkar, S. C., Saini, S., & Mathew, S. (2014b). Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. *International Journal of Microbiology*, 2014, 1–6. doi:10.1155/2014/456878
- Deorukhkar, S., & Saini, S. (2013). Non *albicans Candida* species: its isolation pattern, species distribution, virulence factors and antifungal susceptibility profile. *International Journal of Medical Science and Public Health*, 2(3), 533–538. doi:10.5455/ijmsph.2013.080320131
- Deray, G. (2002). Amphotericin B nephrotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(Suppl. S1), 37–41. doi:10.1093/jac/49.suppl_1.37
- Eddouzi, J., Parker, J. E., Vale-Silva, L. A., Coste, A., Ischer, F., Kelly, S., ... Sanglard, D. (2013). Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from tunisian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3182–3193. doi:10.1128/AAC.00555-13
- Eggimann, P., Garbino, J., & Pittet, D. (2003). Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(11), 685–702. doi:10.1016/S1473-3099(03)00801-6
- Ellepolá, A. N. B., & Morrison, C. J. (2005). Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *The Journal of Microbiology*, 43(S), 65–84. Disponível em http://www.msk.or.kr/jsp/view_old_journalD.asp?THEIDX=2136
- Falagas, M. E., Roussos, N., & Vardakas, K. Z. (2010). Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(11), e954–e966. doi:10.1016/j.ijid.2010.04.006
- Fanning, S., & Mitchell, A. P. (2012). Fungal biofilms. *PLoS Pathogens*, 8(4), e1002585. doi:10.1371/journal.ppat.1002585
- Faria-Ramos, I., Neves-Maia, J., Ricardo, E., Santos-Antunes, J., Silva, A. T., Costa-de-Oliveira, S., ... Pina-Vaz, C. (2014). Species distribution and in vitro antifungal susceptibility profiles of yeast isolates from invasive infections during a Portuguese multicenter survey. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(12), 2241–2247. doi:10.1007/s10096-014-2194-8

- Farmakiotis, D., Kyvernitakis, A., Tarrand, J. J., & Kontoyiannis, D. P. (2015). Early initiation of appropriate treatment is associated with increased survival in cancer patients with *Candida glabrata* fungaemia: a potential benefit from infectious disease consultation. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(1), 79–86. doi:10.1016/j.cmi.2014.07.006
- Ferrari, S., Sanguinetti, M., Torelli, R., Posteraro, B., & Sanglard, D. (2011). Contribution of *CgPDR1*-regulated genes in enhanced virulence of azole-resistant *Candida glabrata*. *PLoS ONE*, 6(3), e17589. doi:10.1371/journal.pone.0017589
- Ferreira, W. F. C., & de Sousa, J. C. F. (2000). Micoses cutâneas e mucocutâneas. In G. Freitas (Ed.), *Microbiologia* (pp. 291–328). Porto: Lidel.
- Finkel, J. S., & Mitchell, A. P. (2011). Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), 109–118. doi:10.1038/nrmicro2475
- Forastiero, A., Garcia-Gil, V., Rivero-Menendez, O., Garcia-Rubio, R., Monteiro, M. C., Alastruey-Izquierdo, A., ... Mellado, E. (2015). Rapid development of *Candida krusei* echinocandin resistance during caspofungin therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(11), 6975–6982. doi:10.1128/AAC.01005-15
- Forastiero, A., Mesa-Arango, A. C., Alastruey-Izquierdo, A., Alcazar-Fuoli, L., Bernal-Martinez, L., Pelaez, T., ... Mellado, E. (2013). *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), 4769–4781. doi:10.1128/AAC.00477-13
- Fukushima, C., Matsuse, H., Saeki, S., Kawano, T., Machida, I., Kondo, Y., & Kohno, S. (2005). Salivary IgA and oral candidiasis in asthmatic patients treated with inhaled corticosteroid. *Journal of Asthma*, 42(7), 601–604. doi:10.1080/02770900500216259
- Garnacho-Montero, J., Díaz-Martín, A., De Piappón, M. R.-P., & García-Cabrera, E. (2012). Infección fúngica invasiva en los pacientes ingresados en las áreas de críticos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(6), 338–343. doi:10.1016/j.eimc.2012.02.011
- Giolo, M. P., & Svidzinski, T. I. E. (2010). Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 46(3), 225–234. doi:10.1590/S1676-24442010000300009
- Golan, Y. (2009). Empiric anti-*Candida* therapy for patients with sepsis in the ICU:

- how little is too little? *Critical Care*, 13(4), 180. doi:10.1186/cc7977
- Gómez, J., García-Vázquez, E., Hernández, A., Espinosa, C., & Ruiz, J. (2010). Candidemias nosocomiales: nuevos retos de un problema emergente. *Revista Española de Quimioterapia*, 23(4), 158–168. Disponível em <http://seq.es/seq/0214-3429/23/4/gomez.pdf>
- Gonçalves, S. S., Souza, A. C. R., Chowdhary, A., Meis, J. F., & Colombo, A. L. (2016). Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses*, 59(4), 198–219. doi:10.1111/myc.12469
- Grover, N. (2010). Echinocandins: a ray of hope in antifungal drug therapy. *Indian Journal of Pharmacology*, 42(1), 9–11. doi:10.4103/0253-7613.62396
- Guery, B. P., Arendrup, M. C., Auzinger, G., Azoulay, É., Borges Sá, M., Johnson, E. M., ... Kullberg, B. J. (2009). Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part II. Treatment. *Intensive Care Medicine*, 35(2), 206–214. doi:10.1007/s00134-008-1339-6
- Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(Suppl. 6), 5–10. doi:10.1111/1469-0691.12539
- Hidalgo, J. A. (2016). Candidiasis. Consultado a 11 de Outubro de 2016, disponível em <http://emedicine.medscape.com/article/213853-overview#showall>
- Huang, W., Zhang, Z., Han, X., Tang, J., Wang, J., Dong, S., & Wang, E. (2002). Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. *Biophysical Journal*, 83(6), 3245–3255. doi:10.1016/S0006-3495(02)75326-5
- Jacobsen, I. D., Wilson, D., Wächtler, B., Brunke, S., Naglik, J. R., & Hube, B. (2012). *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(1), 85–93. doi:10.1586/eri.11.152
- Jiang, C., Dong, D., Yu, B., Cai, G., Wang, X., Ji, Y., & Peng, Y. (2013). Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(4), 778–785. doi:10.1093/jac/dks481
- Kabir, M. A., Hussain, M. A., & Ahmad, Z. (2012). *Candida albicans*: a model organism for studying fungal pathogens. *ISRN Microbiology*, 2012, 1–15. doi:10.5402/2012/538694
- Kasper, L., Seider, K., & Hube, B. (2015). Intracellular survival of *Candida glabrata* in

- macrophages: Immune evasion and persistence. *FEMS Yeast Research*, 15(5), 1–12. doi:10.1093/femsyr/fov042
- Katiyar, S. K., & Edlind, T. D. (2001). Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter genes in *Candida krusei*. *Medical Mycology*, 39(1), 109–116. doi:10.1080/714030988
- Kauffman, C. A. (2008). Candidiasis. In L. Goldman & D. Ausiello (Eds.), *Cecil Medicine* (23rd ed., pp. 2350–2353). Filadélfia, EUA: Saunders Elsevier.
- Kauffman, C. A. (2016a). Overview of *Candida* infections. Consultado a 5 de Junho de 2016, disponível em [https://www.uptodate.com/contents/overview-of-candida-infections?source=search_result&search=candida cutaneas e mucocutaneas&selectedTitle=4~150#H3](https://www.uptodate.com/contents/overview-of-candida-infections?source=search_result&search=candida%20cutaneas%20e%20mucocutaneas&selectedTitle=4~150#H3)
- Kauffman, C. A. (2016b). Treatment of candidemia and invasive candidiasis in adults. Consultado a 8 de Setembro de 2016, disponível em [https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-candidemia-and-invasive-candidiasis-in-adults?source=search_result&search=tratamento candida&selectedTitle=1~150](https://www.uptodate.com/contents/treatment-of-candidemia-and-invasive-candidiasis-in-adults?source=search_result&search=tratamento%20candida&selectedTitle=1~150)
- Kaur, R., Dhakad, M. S., Goyal, R., Bhalla, P., & Dewan, R. (2016). Spectrum of opportunistic fungal infections in HIV/AIDS patients in tertiary care hospital in India. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2016, 1–7. doi:10.1155/2016/2373424
- Kelly, S. ., Lamb, D. ., Kelly, D. ., Manning, N. ., Loeffler, J., Hebart, H., ... Einsele, H. (1997). Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol Δ 5,6 - desaturation. *FEBS Letters*, 400(1), 80–82. doi:10.1016/S0014-5793(96)01360-9
- Kett, D. H., Shorr, A. F., Reboli, A. C., Reisman, A. L., Biswas, P., & Schlamm, H. T. (2011). Anidulafungin compared with fluconazole in severely ill patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: Support for the 2009 IDSA treatment guidelines for candidiasis. *Critical Care*, 15(5), R253. doi:10.1186/cc10514
- Kołaczowska, A., & Kołaczowski, M. (2016). Drug resistance mechanisms and their regulation in non-*albicans* *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(6), 1–13. doi:10.1093/jac/dkv445
- Krogh-Madsen, M., Arendrup, M. C., Heslet, L., & Knudsen, J. D. (2006). Amphotericin B and Caspofungin Resistance in *Candida glabrata* Isolates

- Recovered from a Critically Ill Patient. *Clinical Infectious Diseases*, 42(7), 938–944. doi:10.1086/500939
- Kullberg, B. J., & Arendrup, M. C. (2015). Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 373(15), 1445–1456. doi:10.1056/NEJMra1315399
- Lacasa, E. C., Rodríguez, J. G., Ortega, J. V. G., Mazuelos, E. M., & García, J. P. (2012). Métodos microbiológicos para el diagnóstico, manejo y estudio de la infección fúngica invasora. In R. Cantón & E. Cercenado (Eds.), *Procedimientos en Microbiología Clínica* (pp. 1–21). Disponível em <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia45.pdf>
- Lamping, E., Ranchod, A., Nakamura, K., Tyndall, J. D. A., Niimi, K., Holmes, A. R., ... Cannon, R. D. (2009). Abc1p is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 354–369. doi:10.1128/AAC.01095-08
- Lastauskienė, E., Čepulytė, J., Girkontaitė, I., & Zinkevičienė, A. (2015). Phenotypic switching of *Candida guilliermondii* is associated with pseudohyphae formation and antifungal resistance. *Mycopathologia*, 179(3-4), 205–211. doi:10.1007/s11046-014-9844-3
- Leroy, O., Gangneux, J.-P., Montravers, P., Mira, J.-P., Gouin, F., Sollet, J.-P., ... Lortholary, O. (2009). Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). *Critical Care Medicine*, 37(5), 1612–1618. doi:10.1097/CCM.0b013e31819efac0
- Lewis, R. E., Viale, P., & Kontoyiannis, D. P. (2012). The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida*. *Virulence*, 3(4), 368–376. doi:10.4161/viru.20746
- Lionakis, M. S., & Netea, M. G. (2013). *Candida* and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003079. doi:10.1371/journal.ppat.1003079
- Low, C.-Y., & Rotstein, C. (2011). Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Medicine Reports*, 3, 14. doi:10.3410/M3-14
- Luzzati, R., Cavinato, S., Giangreco, M., Granà, G., Centonze, S., Deiana, M. L., ... Barbone, F. (2013). Peripheral and total parenteral nutrition as the strongest risk factors for nosocomial candidemia in elderly patients: a matched case-control

- study. *Mycoses*, 56(6), 664–671. doi:10.1111/myc.12090
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. doi:10.4161/viru.22913
- McKenzie, C. G. J., Koser, U., Lewis, L. E., Bain, J. M., Mora-Montes, H. M., Barker, R. N., ... Erwig, L. P. (2010). Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infection and Immunity*, 78(4), 1650–1658. doi:10.1128/IAI.00001-10
- Mendes, J. (2012). Abordagem diagnóstica e terapêutica da candidíase invasiva em doentes adultos não-neutropênicos internados em unidades de cuidados intensivos. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 8(2), 76–84. Disponível em <http://spdimc.org/wp/wp-content/uploads/2012/12/RPDI-VOL-8-N-2.1.pdf>
- Milhomens, P. M., Machado, M. C. A. M., Moraes, F. C., Borges, K. R. A., & Diniz, M. R. de F. (2014). Prevalência dos agentes etiológicos das vulvovaginites através de resultados de exames citopatológicos. *Revista de Investigação Biomédica*, 6, 92–102. Disponível em <http://www.ceuma.br/revistaeletronica/index.php/RIB/article/view/61>
- Miller, N. S., Dick, J. D., & Merz, W. G. (2006). Phenotypic switching in *Candida lusitanae* on copper sulfate indicator agar: Association with amphotericin B resistance and filamentation. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1536–1539. doi:10.1128/JCM.44.4.1536-1539.2006
- Miraloglu, M. (2016). Oxidative stress and fungal diseases. *Advance Laboratory Medicine International*, 6(1), 7–16. Disponível em <http://www.scopemed.org/?mno=219269>
- Mistro, S., Maciel, I. de M., de Menezes, R. G., Maia, Z. P., Schooley, R. T., & Badaró, R. (2012). Does lipid emulsion reduce amphotericin B nephrotoxicity? A systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 54(12), 1774–1777. doi:10.1093/cid/cis290
- Modrzewska, B., & Kurnatowski, P. (2015). Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Annals of Parasitology*, 61(1), 3–9. doi:10.1093/cid/cis290
- Moran, G. P., Coleman, D. C., & Sullivan, D. J. (2012). *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why is *C. albicans* more pathogenic? *International Journal of Microbiology*, 2012, 1–7. doi:10.1155/2012/205921
- Moran, G. P., Sanglard, D., Donnelly, S. M., Shanley, D. B., Sullivan, D. J., &

- Coleman, D. C. (1998). Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(7), 1819–1830. Disponível em <http://aac.asm.org/content/42/7/1819.full.pdf+html>
- Moreira-Oliveira, M. S., Mikami, Y., Miyaji, M., Imai, T., Schreiber, A. Z., & Moretti, M. L. (2005). Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24(11), 721–726. doi:10.1007/s10096-005-0041-7
- Morio, F., Pagniez, F., Lacroix, C., Miegerville, M., & Le Pape, P. (2012). Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol Δ 5,6-desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(9), 2131–2138. doi:10.1093/jac/dks186
- Muskett, H., Shahin, J., Eyres, G., Harvey, S., Rowan, K., & Harrison, D. (2011). Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: a systematic review. *Critical Care*, 15(6), R287. doi:10.1186/cc10574
- Nagi, M., Tanabe, K., Ueno, K., Nakayama, H., Aoyama, T., Chibana, H., ... Miyazaki, Y. (2013). The *Candida glabrata* sterol scavenging mechanism, mediated by the ATP-binding cassette transporter Aus1p, is regulated by iron limitation. *Molecular Microbiology*, 88(2), 371–381. doi:10.1111/mmi.12189
- Nakayama, H., Tanabe, K., Bard, M., Hodgson, W., Wu, S., Takemori, D., ... Niimi, M. (2007). The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene *CgAUS1* protects cells against azoles in the presence of serum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(6), 1264–1272. doi:10.1093/jac/dkm321
- Neumann, A., Baginski, M., Winczewski, S., & Czub, J. (2013). The effect of sterols on amphotericin B self-aggregation in a lipid bilayer as revealed by free energy simulations. *Biophysical Journal*, 104(7), 1485–1494. doi:10.1016/j.bpj.2013.02.029
- Nunn, M. A., Schäfer, S. M., Petrou, M. A., & Brown, J. R. M. (2007). Environmental source of *Candida dubliniensis*. *Emerging Infectious Diseases*, 13(5), 747–750. doi:10.3201/eid1305.061179
- Oliveira, G. dos S., Luchese, R. H., Novak, F. R., Abreu, D. P. B. de, & Martins, A. M. D. (2012). Contaminação fúngica no leite humano e em sítios anatômicos de

- lactantes e lactentes. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, 71(3), 450–455. Disponível em <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v71n3/v71n3a03.pdf>
- Oren, I., & Paul, M. (2014). Up to date epidemiology, diagnosis and management of invasive fungal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(Supplement 6), 1–4. doi:10.1111/1469-0691.12642
- Ozcan, K., Ilkit, M., Ates, A., Turac-Bicer, A., & Demirhindi, H. (2010). Performance of Chromogenic *Candida* Agar and CHROMagar *Candida* in recovery and presumptive identification of monofungal and polyfungal vaginal isolates. *Medical Mycology*, 48(1), 29–34. doi:10.3109/13693780802713224
- Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., & Bennett, R. J. (2013). Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003550. doi:10.1371/journal.ppat.1003550
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D., Benjamin, Jr., D. K., Calandra, T. F., Edwards, Jr., J. E., ... Sobel, J. D. (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48(5), 503–535. doi:10.1086/596757
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., ... Sobel, J. D. (2015). Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4), e1–50. doi:10.1093/cid/civ933
- Paramythiotou, E., Frantzeskaki, F., Flevari, A., Armaganidis, A., & Dimopoulos, G. (2014). Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. *Molecules*, 19(1), 1085–1119. doi:10.3390/molecules19011085
- Park, S., Kelly, R., Kahn, J. N., Robles, J., Hsu, M. J., Register, E., ... Perlin, D. S. (2005). Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3264–3273. doi:10.1128/AAC.49.8.3264-3273.2005
- Párola, A. G. (2010). *Estudo epidemiológico de candidíase invasiva na unidade de cuidados intensivos do Hospital Egas Moniz - Centro Hospitalar Lisboa Ocidental*. Universidade de Lisboa. Disponível em http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/4188/1/620654_Tese.pdf
- Patil, S., Rao, R. S., Majumdar, B., & Anil, S. (2015). Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6(1391),

- 1–10. doi:10.3389/fmicb.2015.01391
- Peixoto, J. V., Rocha, M. G., Nascimento, R. T. L., Moreira, V. V., & Kashiwabara, T. G. B. (2014). Candidíase: uma revisão de literatura. *Brasilian Journal of Surgery and Clinical Research*, 8(2), 75–82. Disponível em http://www.mastereditora.com.br/periodico/20141001_074435.pdf
- Pemán, J., Cantón, E., & Espinel-Ingroff, A. (2009). Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(4), 453–460. doi:10.1586/eri.09.18
- Perlroth, J., Choi, B., & Spellberg, B. (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology*, 45(4), 321–346. doi:10.1080/13693780701218689
- Pfaller, M. A. (2012). Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*, 125(1), S3–S13. doi:10.1016/j.amjmed.2011.11.001
- Pfaller, M. A. (2016). Antifungal susceptibility testing. Consultado a 6 de Julho de 2016, disponível em [https://www.uptodate.com/contents/antifungal-susceptibility-testing?source=search_result&search=antifungal susceptibility testing&selectedTitle=1~150](https://www.uptodate.com/contents/antifungal-susceptibility-testing?source=search_result&search=antifungal%20susceptibility%20testing&selectedTitle=1~150)
- Pfaller, M. A., Castanheira, M., Lockhart, S. R., Ahlquist, A. M., Messer, S. A., & Jones, R. N. (2012). Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1199–1203. doi:10.1128/JCM.06112-11
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 133–163. doi:10.1128/CMR.00029-06
- Pinjon, E., Jackson, C. J., Kelly, S. L., Sanglard, D., Moran, G., Coleman, D. C., & Sullivan, D. J. (2005). Reduced azole susceptibility in genotype 3 *Candida dubliniensis* isolates associated with increased *CaCDR1* and *CdCDR2* expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1312–1318. doi:10.1128/AAC.49.4.1312-1318.2005
- Póvoa, P., & Gonçalves-Pereira, J. (2011). Treatment of candidemia in adult patients without neutropenia - an inconvenient truth. *Critical Care*, 15(1), 1–3. doi:10.1186/cc9414

- Quindós, G., Eraso, E., López-Soria, L. M., & Ezpeleta, G. (2012). Enfermedad fúngica invasora: ¿Diagnóstico micológico convencional o molecular? *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(9), 560–571. doi:10.1016/j.eimc.2011.10.018
- Rimek, D., Singh, J., & Kappe, R. (2003). Cross-reactivity of the Platelia *Candida* antigen detection enzyme immunoassay with fungal antigen extracts. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3395–3398. doi:10.1128/JCM.41.7.3395-3398.2003
- Rodrigues, C. F., Silva, S., & Henriques, M. (2014). *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(5), 673–688. doi:10.1007/s10096-013-2009-3
- Roetzer, A., Gratz, N., Kovarik, P., & Schüller, C. (2010). Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cellular Microbiology*, 12(2), 199–216. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01391.x
- Ruhnke, M. (2014). Antifungal stewardship in invasive *Candida* infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(Suppl. 6), 11–18. doi:10.1111/1469-0691.12622
- Sabino, R., Veríssimo, C., Brandão, J., Alves, C., Parada, H., Rosado, L., ... Pais, C. (2010). Epidemiology of candidemia in oncology patients: a 6-year survey in a Portuguese central hospital. *Medical Mycology*, 48(2), 346–354. doi:10.3109/13693780903161216
- Sampaio, P., & Pais, C. (2014). Epidemiology of invasive candidiasis and challenges for the mycology laboratory: specificities of *Candida glabrata*. *Current Clinical Microbiology Reports*, 1, 1–9. doi:10.1007/s40588-014-0002-y
- Sanglard, D. (2016). Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Frontiers in Medicine*, 3(11), 1–10. doi:10.3389/fmed.2016.00011
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., & Lass-Flörl, C. (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 58(Suppl. 2), 2–13. doi:10.1111/myc.12330
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. S. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62(1), 10–24. doi:10.1099/jmm.0.045054-0
- Schell, W. A. (2015). Biology of *Candida* infections. Consultado a 25 de Agosto de 2016, disponível em https://www.uptodate.com/contents/biology-of-candida-infections?source=search_result&search=biology+candida&selectedTitle=1~150

- Shields, R. K., Nguyen, M. H., Press, E. G., Cumbie, R., Driscoll, E., Pasculle, A. W., & Clancy, C. J. (2015). Rate of *FKS* mutations among consecutive *Candida* isolates causing bloodstream infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(12), 7465–7470. doi:10.1128/AAC.01973-15
- Silva, A. P., Miranda, I. M., Guida, A., Synnott, J., Rocha, R., Silva, R., ... Rodrigues, A. G. (2011). Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida parapsilosis* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3546–3556. doi:10.1128/AAC.01127-10
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 288–305. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x
- Sitnik, R., Marra, A. R., Petroni, R. C., Ramos, O. P. S., Martino, M. D. V., Pasternak, J., ... Pinho, J. R. R. (2014). SeptiFast for diagnosis of sepsis in severely ill patients from a Brazilian hospital. *Einstein (São Paulo)*, 12(2), 191–197. doi:10.1590/S1679-45082014AO2932
- Smeekeens, S. P., van de Veerdonk, F. L., Kullberg, B. J., & Netea, M. G. (2013). Genetic susceptibility to *Candida* infections. *EMBO Molecular Medicine*, 5(6), 805–813. doi:10.1002/emmm.201201678
- Sobel, J. D. (2015). Candidiasis. In D. R. Hospenhal & M. G. Rinaldi (Eds.), *Diagnosis and Treatment of Fungal Infections* (pp. 101–117). Cham, Suíça: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-13090-3_8
- Spampinato, C., & Leonardi, D. (2013). *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Research International*, 2013, 1–13. doi:10.1155/2013/204237
- Staniszewska, M., Bondaryk, M., Siennicka, K., Piłat, J., Schaller, M., & Kurzątkowski, W. (2012). Role of aspartic proteinases in *Candida albicans* virulence. Part II: expression of *SAP1-10* aspartic proteinase during *Candida albicans* infections in vivo. *Post. Mikrobiol.*, 51(2), 137–142. Disponível em <http://www.pm.microbiology.pl/web/archiwum/vol5122012137.pdf>
- Sullivan, D. J., Moran, G. P., Pinjon, E., Al-Mosaid, A., Stokes, C., Vaughan, C., & Coleman, D. C. (2004). Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 4, 369–376. doi:10.1016/S1567-1356(03)00240-X

- Thompson, D. S., Carlisle, P. L., & Kadosh, D. (2011). Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryotic Cell*, 10(9), 1173–1182. doi:10.1128/EC.05085-11
- Tscherner, M., Schwarzmüller, T., & Kuchler, K. (2011). Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata*. *Pharmaceuticals*, 4(12), 169–186. doi:10.3390/ph4010169
- University of Adelaide. (2016). *Pichia kudriavzevii*. Consultado a 5 de Novembro de 2016, disponível em http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Yeasts/Pichia/kudriavzevii.html
- Vale-Silva, L. A., & Sanglard, D. (2015). Tipping the balance both ways: Drug resistance and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, 15(4), 1–8. doi:10.1093/femsyr/fov025
- Vandeputte, P., Larcher, G., Bergès, T., Renier, G., Chabasse, D., & Bouchara, J.-P. (2005). Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11), 4608–4615. doi:10.1128/AAC.49.11.4608
- Vazquez, J. (2010). Invasive fungal infections in the intensive care unit. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 31(1), 79–86. doi:10.1055/s-0029-1246289
- Vermes, A., Guchelaar, H. J., & Dankert, J. (2000). Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(2), 171–179. doi:10.1093/jac/46.2.171
- Viriato, A. (2014). Terpenoides com atividade antifúngica para *Candida Berkhout*, causadoras de infecções hospitalares. *O Mundo Da Saúde*, 38(1), 40–50. doi:10.15343/0104-7809.20143801040050
- Voigt, J., Hünninger, K., Bouzani, M., Jacobsen, I. D., Barz, D., Hube, B., ... Kurza, O. (2014). Human natural killer cells acting as phagocytes against *Candida albicans* and mounting an inflammatory response that modulates neutrophil antifungal activity. *Journal of Infectious Diseases*, 209(4), 616–626. doi:10.1093/infdis/jit574
- Wächtler, B., Citiulo, F., Jablonowski, N., Förster, S., Dalle, F., Schaller, M., ... Hube, B. (2012). *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS*

- ONE, 7(5), e36952. doi:10.1371/journal.pone.0036952
- Walker, L. A., Gow, N. A. R., & Munro, C. A. (2010). Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genetics and Biology*, 47(2), 117–126. doi:10.1016/j.fgb.2009.09.003
- Wang, Y.-C., Huang, S.-H., Lan, C.-Y., & Chen, B.-S. (2012). Prediction of phenotype-associated genes via a cellular network approach: a *Candida albicans* infection case study. *PLoS ONE*, 7(4), e35339. doi:10.1371/journal.pone.0035339
- Whibley, N., & Gaffen, S. L. (2015). Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species. *Cytokine*, 76(1), 42–52. doi:10.1016/j.cyto.2015.07.025
- Williams, D., & Lewis, M. (2011). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Microbiology*, 3, 5771. doi:10.3402/jom.v3i0.5771
- Wilson, A., Delport, J., & Ponich, T. (2014). *Candida glabrata* esophagitis: are we seeing the emergence of a new azole-resistant pathogen? *International Journal of Microbiology*, 2014, 1–4. doi:10.1155/2014/371631
- Wirsching, S., Moran, G. P., Sullivan, D. J., Coleman, D. C., & Morschhäuser, J. (2001). *MDR1*-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(12), 3416–3421. doi:10.1128/AAC.45.12.3416-3421.2001
- World Health Organization. (2016). Emerging diseases. Consultado a 5 de Novembro de 2016, disponível em http://www.who.int/topics/emerging_diseases/en/
- Wüthrich, M., Deepe, G. S., & Klein, B. (2012). Adaptive immunity to fungi. *Annual Review of Immunology*, 30, 115–148. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074958
- Yapar, N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 10, 95–105. doi:10.2147/TCRM.S40160
- Young, L. Y., Hull, C. M., & Heitman, J. (2003). Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 2717–2724. doi:10.1128/AAC.47.9.2717-2724.2003
- Zarrin, M., & Mahmoudabadi, A. Z. (2009). Invasive candidiasis; a review article. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2(1), 1–6. Disponível em <http://jjmicrobiol.com/3707.fulltext>